

**Divergencia inducida por *Wolbachia*  
en la zona híbrida de *Chorthippus*  
*parallelus* (Orthoptera).**

**Paloma Martínez Rodríguez**



**Tesis doctoral**

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Junio de 2013**



**DIVERGENCIA INDUCIDA POR *WOLBACHIA* EN LA ZONA HÍBRIDA DE  
*CHORTHIPPUS PARALLELUS* (ORTHOPTERA).**

Memoria presentada por Paloma Martínez Rodríguez para optar al grado de Doctora en Ciencias (Biológicas) por la Universidad Autónoma de Madrid, con Mención Europea.

Paloma Martínez Rodríguez

**Vº Bº del Director de la tesis doctoral**

Dr. José L. Bella Sombría  
Departamento de Biología (Genética)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid





Esta investigación ha sido financiada por los proyectos CGL2009-08380/BOS, CGL2005-02898 y CGL2012-35007 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Gracias a las distintas instituciones que han financiado mi formación durante estos años, tanto a la propia Universidad Autónoma de Madrid, como a la Universidad de Washington, la fundación UNED, y al Frospsects.

Por otra parte, agradecemos a los gobiernos de la Comunidad Autónoma de Madrid, Andalucía, Castilla y León y Aragón, y al resto de autoridades la concesión de los permisos necesarios para realizar los muestreos programados en este estudio. Igualmente, queremos agradecer al Gobierno Francés e Italiano, y en concreto a las autoridades del Parque Nacional de Los Pirineos y del Parque Nacional de Mercantour y Alpes Marítimos, la concesión de los permisos para la captura de los individuos de esas procedencias empleados en este estudio. En este último caso, quisiera agradecer al proyecto Mercantour/Alpi Marittime ATBI +M, y en concreto a Doña Marta de Biaggi, la gestión de dichos permisos, y el interés mostrado en todo momento por nuestros resultados.

Así mismo, queremos dar las gracias al Dr. Günter Köhler (Friedrich-Schiller-University, Institute of Ecology), al Dr. Snorre Stuen (Norwegian School of Veterinary Science, Department of Production Animal Clinical Sciences), al Dr. Roger K. Butlin (University of Sheffield, Department of Animal and Plant Sciences), al Dr. Juan P. Martínez-Camacho (Universidad de Granada, Departamento de Genética) y al Dr. Rok Kostanjšek (Univerza v Ljubljani, Department of Zoology) por facilitarnos parte del material biológico analizado en este estudio.



El camino hacia la cima es, como la marcha hacia uno mismo, una ruta en solitario  
(aunque yo he tenido la suerte de tener buena compañía).

Alessandro Gogna



# AGRADECIMIENTOS

No sé cuántas veces, mentalmente, he escrito estas líneas. Y es que tengo la suerte de poder nombrar a mucha gente que me ha ayudado incondicionalmente durante estos años (espero no dejarme a nadie...).

En primer lugar, quiero agradecerle a Pepe la confianza puesta en mi trabajo, y todo su apoyo durante estos años, tanto durante el desarrollo de esta tesis doctoral, como previamente, como tutor durante mi licenciatura. Y es que, como dijo *Reinhold Messner*, “nada habría podido suceder si alguien no lo hubiera imaginado”.

También querría agradecerles a todas aquellas personas con las que he compartido estos años de laboratorio. Gracias por su apoyo y su paciencia:

Gracias especialmente a Paqui, por enseñarme a *trabajar*, desde un punto de vista técnico, pero también humano. Muchas gracias por tus consejos y sobre todo por tu paciencia. Quizás algún día consiga recordar donde está cada cosa.

Gracias a Mario por construir los cimientos en los que se asienta este trabajo. Sin tu esfuerzo esta tesis no sería la misma.

Gracias a Jonás, a María, a Miguel, a Javi, a Aurora y a todos aquellos con los que he compartido pipetas y bancada. Gracias por aguantar mi falta de experiencia.

Y por supuesto gracias a Begoña, a Carlos, a Carmen, a Jaime, a Joaquina, a Pepe y a Rosa, por su ayuda y sus consejos. Por sus sugerencias y por estar siempre abiertos a discutir resultados.

También quiero agradecerles su ayuda a los de fuera:

Gracias a Juan, por hacerme un hueco en la ETSI Agrónomos en momentos de crisis, y por echarnos una mano todas las veces que le hemos dado la lata.

Gracias a Marta, por abrirme su laboratorio, y permitirme comenzar el estudio de las comunidades bacterianas en *Chorthippus*.

Gracias a Rafa, por permitirme explorar la formalización matemática de muchas ideas dispartadas.

Gracias a Pedro, por enseñarme a incluir en parafina y cortar con el microtomo.

Gracias a Phil, por leerse y re-leerse los *papers*. Espero no “odiar” mucho mi trabajo.

Y muy especialmente, gracias a Richard, y a Ellie, por permitirme descubrir la zona híbrida de *Podisma*, y abrirme su casa. Por su confianza y su tiempo.

Querría también dar las gracias a los más cercanos:

Gracias a Raquel, a Laura, a Clara y a Almu. Gracias por esas cenas reconvertidas en *seminarios* (y por muchas más cosas...). Y a Carles, a Jacopo y a los dos “Javis”, por aguantarnos (a su pesar).

Gracias a Pepe, por abrirme los ojos en muchas cosas. Y a Tolo, a Luiso y a Ara, por ser únicos. Gracias “apañeros”.

Gracias a mi familia, por creer en mí y animarme *a seguir*.

Gracias a Javi, por estar siempre ahí. Por dejarse engañar (a sabiendas) y apoyarme en todo lo que hago. Por ayudarme en los muestreos en Alpes, y hasta por aprender a pipetear si es necesario.

Y por supuesto, gracias a mis padres y a mi hermana. Por todo. Absolutamente por todo.

# ÍNDICE

<b>ACRÓNIMOS FRECUENTES</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1 EL CONCEPTO DE ESPECIE (O POR QUÉ NO EXISTE UNA DEFINICIÓN SATISFACTORIA). .....	7
2 ESPECIACIÓN Y BARRERAS REPRODUCTIVAS. ....	9
2.1 Barreras al flujo génico. ....	11
3 LAS ZONAS HÍBRIDAS COMO COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS PROCESOS DE ESPECIACIÓN. ....	12
3.1 El interés de las zonas híbridas, como laboratorios naturales. ....	13
3.2 Clinas. ....	14
3.3 El modelo de Dobzhansky-Muller. ....	15
3.4 La regla de Haldane. ....	17
4 LA ZONA HÍBRIDA DE <i>CHORTHIPPUS PARALLELUS</i> . ....	18
5 <i>WOLBACHIA</i> .....	22
5.1 ¿Especiación por simbiosis? .....	22
5.2 Incompatibilidad citoplasmática. ....	23
5.3 Transmisión de <i>Wolbachia</i> . ....	26
5.4 Modelos matemáticos. ....	27
6 INFECCIÓN POR <i>WOLBACHIA</i> EN <i>C. PARALLELUS</i> . ....	29
7 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE <i>WOLBACHIA</i> . ....	30
7.1 Sistemas de Clasificación Multilocus: una aproximación a la identificación de clones bacterianos. ....	32
7.2 Diseño de Sistemas de Clasificación Multilocus (MLST). ....	32
7.3 Caracterización de cepas. ....	33
7.4 Bases de datos de MLST. ....	33
7.5 Análisis e interpretación de los datos MLST. ....	34
7.6 Aplicaciones y limitaciones del sistema MLST. ....	34
7.7 Sistema de Clasificación Multilocus para <i>Wolbachia</i> . ....	35
7.7.1 Información disponible en las bases de datos. ....	35
7.7.2 <i>Loci</i> seleccionados en el análisis de cepas de <i>Wolbachia</i> . ....	36
8 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA. ....	37
8.1 Filogenia molecular. ....	38
8.2 Alineamiento múltiple: punto crítico en el análisis filogenético. ....	39

8.3	Selección del modelo evolutivo.....	41
8.4	Inferencia filogenética.....	42
8.5	Máxima Verosimilitud (ML).....	43
8.6	Inferencia Bayesiana (IB).....	43
9	COMUNIDAD BACTERIANA DE <i>C. PARALLELUS</i> : DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIONTES.....	44
9.1	<i>Spiroplasma</i> .....	46
9.2	Detección de endosimbiontes mediante FISH.....	47
10	TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE <i>WOLBACHIA</i> .....	48
10.1	Nematomorpha.....	51
10.2	Tachinidae.....	54
	<b>OBJETIVOS</b> .....	57
	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	59
11	OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	59
12	TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE <i>WOLBACHIA</i> .....	60
13	EXTRACCIÓN DE ADN.....	62
13.1	Extracción de ADN a partir de muestras incluidas en parafina.....	64
14	DETECCIÓN DE <i>WOLBACHIA</i> MEDIANTE PCR.....	65
15	CARACTERIZACIÓN DE <i>WOLBACHIA</i> MEDIANTE MLST.....	66
16	CARACTERIZACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.....	69
16.1	Estudio de las variaciones intra-anales.....	70
17	MODELIZACIÓN MATEMÁTICA.....	70
17.1	Evolución de las frecuencias de infección considerando una única cepa.....	73
17.2	Evolución de las frecuencias de infección considerando dos cepas.....	73
17.2.1	Modelo restrictivo.....	75
17.2.2	Modelo relajado.....	75
17.3	Evolución de frecuencias con variación intra-generacional.....	76
18	CLASIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES ACORDE CON SUS FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.....	77
19	ANÁLISIS FILOGENÉTICO I.....	80
19.1	Muestreo genético.....	80
19.2	Análisis de secuencias y alineamiento múltiple.....	82
19.3	Análisis de saturación.....	83
19.4	Selección del modelo evolutivo.....	84
20	ANÁLISIS FILOGENÉTICO II: INFERENCIA FILOGENÉTICA.....	86



20.1	Genes 16S <i>rRNA</i> , <i>loci</i> descritos en el MLST y gen <i>wsp</i> .	86
20.2	Máxima Verosimilitud.	86
20.3	Inferencia Bayesiana	87
20.4	Recombinación.	88
20.5	Comparación de topologías.	89
21	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>WOLBACHIA</i> AMPLIFICADAS.	89
22	ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE <i>WOLBACHIA</i> INFECTANDO A LAS DISTINTAS POBLACIONES.	92
22.1	Análisis de la estructuración genética de las poblaciones mediante el software <i>Structure</i> .	92
22.2	Análisis Bayesiano de Genealogías.	94
22.3	Análisis de la varianza molecular o test de AMOVA.	95
22.4	Test de Mantel: Correlación entre las distancias genéticas y geográficas, aislamiento por distancia y separación de grupos genéticos.	96
23	DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES POR PCR-DGGE.	96
23.1	Detección de Eubacterias mediante PCR.	98
23.2	Detección y amplificación por PCR del género <i>Spiroplasma</i> .	99
23.3	Análisis poblacional de la infección por <i>Spiroplasma</i> en <i>C. parallelus</i> .	99
23.4	Análisis filogenético del género <i>Spiroplasma</i> .	99
23.5	Análisis de la independencia entre ambos endosimbiontes.	100
24	DETECCIÓN DE <i>WOLBACHIA</i> MEDIANTE FISH, IMPLEMENTACIÓN DE LA WCH.	100
24.1	Detección en tejido.	101
24.2	Detección en aplastados de testículo.	104
25	DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE WCH.	105
<b>RESULTADOS</b>		107
26	INFECCIÓN DE <i>WOLBACHIA</i> EN <i>C. PARALLELUS</i> . FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.	107
26.1	Infección por <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i> . Variación entre sexos.	107
26.2	Infección por <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i> . Variación interanual.	107
26.3	Infección por <i>Wolbachia</i> a lo largo del transecto de la zona híbrida.	118
26.4	Estructuración genética de las poblaciones.	121
27	VARIACIÓN INTRA-GENERACIONAL DE LA INFECCIÓN POR <i>WOLBACHIA</i> .	128
27.1	Diferencias en la infección entre poblaciones.	128
27.2	Variación intra-generacional de la infección por <i>Wolbachia</i> .	129
27.3	Factores medioambientales: comparación entre las temperaturas en ambas poblaciones.	130
27.4	Efecto de la variación de las frecuencias de infección en la dinámica de la infección. Modelización matemática.	132

27.5	Evolución de la infección por una única cepa. ....	132
27.6	Evolución de la doble infección. ....	135
27.6.1	Modelo restrictivo y relajado sin variación intrageneracional. ....	135
27.6.2	Modelos restrictivo y relajado, incorporando la variación intrageneracional. ....	136
28	FILOGENIA Y FILOGEOGRAFÍA DE <i>WOLBACHIA</i> . ....	138
28.1	Variabilidad de la infección por <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i> . ....	138
28.2	Inferencia filogenética del gen <i>16S rRNA</i> . ....	139
28.3	Análisis de las cepas de <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i> mediante MLST. ....	141
28.3.1	Caracterización y clasificación de las cepas detectadas de <i>Wolbachia</i> empleando el MLST. Diversidad genética de los distintos loci analizados. ....	142
28.3.2	Análisis filogenético de los distintos <i>loci</i> implementados en el MLST:.....	143
28.3.3	Clasificación de las cepas detectadas infectando a <i>C. parallelus</i> .....	158
28.3.4	Filogenia de <i>Wolbachia</i> a partir de una aproximación Multilocus: Filogenia de los cinco <i>loci</i> concatenados. ....	166
28.4	Clasificación de cepas, acorde con el gen <i>wsp</i> . ....	169
28.5	Filogeografía de <i>Wolbachia</i> . ....	170
28.5.1	Localización geográfica de los alelos detectados para los distintos genes del sistema MLST.....	170
28.5.2	Detección de los distintos complejos.....	176
28.5.3	Localización geográfica de los alelos del gen <i>wsp</i> .....	177
28.6	Estructura genética de las poblaciones. ....	178
28.7	Genealogía de las cepas bacterianas empleando el software <i>ClonalFrame</i> . ....	186
28.8	Filogeografía de los supergrupos F y B. ....	189
28.8.1	Filogeografía del supergrupos F. ....	189
28.8.2	Filogeografía del supergrupo B. ....	194
29	DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE PCR-DGGE.....	195
29.1	Identificación del género <i>Wolbachia</i> en el ensayo PCR-DGGE.....	196
29.2	Identificación de <i>Spiroplasma</i> . ....	196
29.3	Identificación de otras bacterias. ....	197
29.4	Reconstrucción filogenética. ....	199
29.5	Multi-infección por los géneros <i>Wolbachia</i> y <i>Spiroplasma</i> .....	199
29.6	Filogeografía de la infección por <i>Spiroplasma</i> . ....	200
30	DETECCIÓN DE <i>WOLBACHIA</i> Y OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE WCH.....	207
30.1	Detección de <i>Wolbachia</i> mediante WCH en tejidos incluidos en parafina.....	207
30.2	Detección de otros endosimbiontes mediante WCH. ....	211
30.3	Detección de <i>Wolbachia</i> mediante WCH en aplastados de testículo de saltamontes. ....	214
31	TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE <i>WOLBACHIA</i> EN <i>C. PARALLELUS</i> .....	215

31.1	Incidencia de parasitoides en <i>C. parallelus</i> .....	215
31.2	Infección por <i>Wolbachia</i> en la familia Tachinidae.....	217
31.2.1	Caracterización molecular de las cepas de <i>Wolbachia</i> que infectan a la familia Tachinidae.....	220
31.3	Infección por <i>Wolbachia</i> en el <i>Phylum</i> Nematomorpha.....	222
31.3.1	Caracterización molecular de las cepas de <i>Wolbachia</i> infectando al <i>Phylum</i> Nematomorpha. ....	223
31.4	Caracterización de la infección por <i>Wolbachia</i> en otras especies de ortópteros. ....	225
<b>DISCUSIÓN</b> .....		229
32	INFECCIÓN DE <i>WOLBACHIA</i> EN <i>C. PARALLELUS</i> . FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.....	229
32.1	Variación interanual de la infección por <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i> . ....	229
32.2	Patrones diferenciales de infección en la zona híbrida .....	231
32.3	“The coupling hypothesis” .....	233
32.4	Análisis de la estructuración poblacional. ....	234
33	VARIACIÓN INTRA-GENERACIONAL DE LA INFECCIÓN POR <i>WOLBACHIA</i> .....	237
33.1	Factores genéticos. ....	239
33.2	Descenso de la coinfección asociada a los machos. ....	240
33.3	Factores ambientales: ¿Podría la temperatura modular la infección por <i>Wolbachia</i> en la Península Ibérica? .....	242
33.4	Simulaciones matemáticas .....	244
33.4.1	Progresión de la infección por una única cepa.....	245
33.4.2	Progresión de la infección por dos cepas de <i>Wolbachia</i> : Efecto del descenso de las frecuencias de la coinfección en la dinámica de <i>Wolbachia</i> . ....	246
34	FILOGENIA Y FILOGEOGRAFÍA DE <i>WOLBACHIA</i> .....	248
34.1	Caracterización de las cepas de <i>Wolbachia</i> que infectan a <i>C. parallelus</i> en base al gen <i>16S rRNA</i> .....	248
34.2	Filogenia del género <i>Wolbachia</i> basada en los genes del MLST.....	250
34.3	Recombinación entre cepas bacterianas. ....	251
34.4	Aparición de alelos raros en las poblaciones híbridas. ....	253
34.5	Caracterización de los complejos ST detectados y su relación con los patrones de infección.....	254
34.6	Problemas asociados a la reconstrucción filogenética en bacterias: construcción de genealogías. ....	255
34.7	Estructuración geográfica de las cepas detectadas. ....	256
34.8	Análisis de la estructuración geográfica mediante <i>Structure</i> . ....	258
34.9	Análisis de la estructuración geográfica mediante <i>ClonalFrame</i> .....	261
34.10	Comparación entre los resultados de <i>Structure</i> y <i>ClonalFrame</i> . ....	262

34.11	Análisis de la varianza molecular y Test de Mantel.....	264
34.12	El sistema de clasificación mediante el gen <i>wsp</i> . ....	268
34.13	Modos de adquisición de la infección. ....	269
34.14	El origen de la infección en <i>C. parallelus</i> . ....	271
34.14.1	Supergrupo F. ....	271
34.14.2	Diversidad dentro y entre complejos ST adscritos al supergrupo F de <i>Wolbachia</i> que infectan a <i>C. parallelus</i> . ....	271
34.14.3	Supergrupo B. ....	277
34.14.4	Diversidad dentro y entre complejos ST adscritos al supergrupo B de <i>Wolbachia</i> que infectan a <i>C. parallelus</i> . ....	277
34.14.5	Transmisión horizontal vs. introgresión. ....	279
34.14.6	Visión general del origen de la infección. ....	282
34.15	Importancia de la existencia de varios supergrupos de <i>Wolbachia</i> (F y B), infectando a <i>C. parallelus</i> . IC unidireccional y bidireccional. ....	282
34.16	Interacción entre las incompatibilidades genómicas y aquellas inducidas por <i>Wolbachia</i> . ....	287
34.17	La regla de Haldane: Incompatibilidades nucleares en <i>C. parallelus</i> y su interacción con <i>Wolbachia</i> . ....	288
34.18	Posible interacción entre factores citoplasmáticos asociados a la infección por <i>Wolbachia</i> y el cromosoma X de Cpp. ....	293
34.19	Utilidad del MLST en la valoración de las consecuencias de la IC en la zona híbrida de <i>C. parallelus</i> . ....	297
34.20	Relevancia del supergrupo F infectando a <i>C. parallelus</i> . ....	297
34.21	Posibles implicaciones de la infección por distintas cepas F de <i>Wolbachia</i> en la dinámica de la zona híbrida de <i>C. parallelus</i> . ....	298
34.22	Posibles implicaciones de la aparición de cepas recombinantes en las poblaciones híbridas de <i>C. parallelus</i> . ....	299
34.23	<i>Wolbachia</i> y su papel en el “reinforcement”. ....	301
35	DETECCIÓN DE WOLBACHIA Y OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE PCR-DGGE .....	303
35.1	Ecología microbiana de <i>C. parallelus</i> : Análisis mediante PCR-DGGE. ....	303
35.1.1	Confirmación de la infección por <i>Wolbachia</i> . ....	303
35.1.2	Infección por <i>Spiroplasma</i> . ....	305
35.1.3	Infección por otras bacterias. ....	307
35.2	Interacción entre <i>Wolbachia</i> y <i>Spiroplasma</i> . ....	308
35.3	Filogeografía de la infección por <i>Spiroplasma</i> . ....	310
36	DETECCIÓN DE WOLBACHIA Y OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE WCH. ....	312
36.1	Detección de <i>Wolbachia</i> mediante WCH. ....	312
36.2	Aproximación a la localización del resto de la comunidad bacteriana de <i>C. parallelus</i> mediante WCH. ....	317
37	TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE WOLBACHIA EN <i>C. PARALLELUS</i> . ....	319

37.1 Familia Tachinidae. ....	320
37.2 Phylum Nematomorpha.....	321
37.3 Infección por <i>Wolbachia</i> en tachínidos .....	324
37.4 Infección por <i>Wolbachia</i> en nematomorfos.....	328
<b>CONCLUSIONES</b> .....	333
<b>CONCLUSIONS</b> .....	333
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	337
 <b>ANEXOS:</b>	
ANEXO A: FIGURAS COMPLEMENTARIAS.....	I
ANEXO B: TABLAS COMPLEMENTARIAS.....	XXII
ANEXO C: FRECUENCIAS DE INFECCIÓN .....	LI
ANEXO D: DATOS MLST .....	LVII
ANEXO E: MUESTREO GENÉTICO.....	LXIII



# ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 .....	10
Fig. 2 .....	16
Fig. 3 .....	16
Fig. 4 .....	20
Fig. 5 .....	22
Fig. 6 .....	25
Fig. 7 .....	60
Fig. 8 .....	61
Fig. 9 .....	62
Fig. 10 .....	64
Fig. 11 .....	69
Fig. 12 .....	74
Fig. 13 .....	79
Fig. 14 .....	90
Fig. 15 .....	103
Fig. 16-A a 16-F .....	111
Fig. 16-continuación: 16-G a 16-L .....	112
Fig. 16-continuación: 16-M a 16-O .....	113
Fig. 17 .....	115
Fig. 18 .....	116
Fig. 19 .....	117
Fig. 20 .....	118
Fig. 21 .....	119
Fig. 22 .....	119
Fig. 23 .....	120
Fig. 24 .....	120
Fig. 25 .....	122
Fig. 26 .....	123
Fig. 27 .....	124
Fig. 28 .....	125
Fig. 29 .....	131
Fig. 30 .....	131
Fig. 31 .....	132

Fig. 32.....	133
Fig. 33.....	137
Fig. 34.....	140
Fig. 35.....	141
Fig. 36.....	144
Fig. 37.....	146
Fig. 38.....	147
Fig. 39.....	148
Fig. 40.....	149
Fig. 41.....	151
Fig. 42.....	153
Fig. 43.....	155
Fig. 44.....	157
Fig. 45.....	160
Fig. 46.....	163
Fig. 47.....	166
Fig. 48.....	167
Fig. 49.....	168
Fig. 50.....	171
Fig. 51.....	172
Fig. 52.....	173
Fig. 53.....	174
Fig. 54.....	175
Fig. 55.....	176
Fig. 56.....	177
Fig. 57.....	181
Fig. 58.....	181
Fig. 59.....	182
Fig. 60.....	183
Fig. 61.....	185
Fig. 62.....	185
Fig. 63.....	187
Fig. 64.....	190
Fig. 65.....	191



Fig. 66 .....	192
Fig. 67 .....	195
Fig. 68 .....	202
Fig. 69 .....	203
Fig. 70 .....	209
Fig. 71 .....	209
Fig. 72 .....	210
Fig. 73 .....	211
Fig. 74. ....	213
Fig. 75 .....	216
Fig. 76 .....	217
Fig. 77 .....	218
Fig. 78 .....	220
Fig. 79 .....	224
Fig. 80 .....	227
Fig. 81 .....	232
Fig. 82 .....	272
Fig. 83 .....	285
Fig. 84 .....	290
Fig. 85 .....	291
Fig. 86 .....	293
Fig. 87 .....	296
Fig. 88 .....	315



# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 .....	45
Tabla 2 .....	67
Tabla 3 .....	71
Tabla 4 .....	127
Tabla 5 .....	129
Tabla 6 .....	159
Tabla 7 .....	181
Tabla 8 .....	193
Tabla 9 .....	194
Tabla 10 .....	198
Tabla 11 .....	203
Tabla 12 .....	205
Tabla 13 .....	205
Tabla 14 .....	206
Tabla 15 .....	219
Tabla 16 .....	222
Tabla 17 .....	222
Tabla 18 .....	225



# ANEXO A

Fig. A1 .....	II
Fig. A2 .....	III
Fig. A3 .....	IV
Fig. A4 .....	V
Fig. A5 .....	VI
Fig. A6 .....	VII
Fig. A7 .....	VIII
Fig. A8 .....	IX
Fig. A9 .....	X
Fig. A10 .....	XI
Fig. A11 .....	XII
Fig. A12 .....	XIII
Fig. A13 .....	XIV
Fig. A14 .....	XV
Fig. A15 .....	XVI
Fig. A16 .....	XVII
Fig. A17 .....	XVIII
Fig. A18 .....	XIX
Fig. A19 .....	XIX
Fig. A20 .....	XIX
Fig. A21 .....	XX
Fig. A22 .....	XX
Fig. A23 .....	XXI

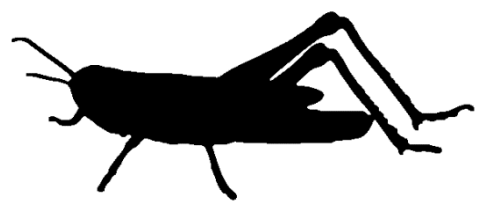


## ANEXO B

Tabla B1: .....	XXII
Tabla B2: .....	XXV
Tabla B3: .....	XXVII
Tabla B4: .....	XXVIII
Tabla B5: .....	XXIX
Tabla B6: .....	XXX
Tabla B7: .....	XXXI
Tabla B8: .....	XXXII
Tabla B9: .....	XXXIII
Tabla B10: .....	XXXIV
Tabla B11: .....	XXXVI
Tabla B12: .....	XXXVII
Tabla B13: .....	XXXVII
Tabla B14: .....	XXXVIII
Tabla B15: .....	XXXIX
Tabla B16: .....	XLI
Tabla B17: .....	XLII
Tabla B18: .....	XLIII
Tabla B19: .....	XLIV
Tabla B20: .....	XLV
Tabla B21: .....	XLVI
Tabla B22: .....	XLVII
Tabla B23: .....	XLVIII
Tabla B24: .....	XLIX









# ACRÓNIMOS FRECUENTES

**a.e.c:** Antes de la era común. Alternativo de a.C.

**AMOVA:** *Analysis of Molecular Variance*.

**ANOVA:** *Analysis of variance*.

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*.

**Complejo Cp\_ST(X):** Complejo ST detectado en *C. parallellus*.

**CoxA:** gen que codifica para la subunidad catalítica de la “*cytochrome oxidase*” de la cadena respiratoria .

**Cp\_ST(X):** “*Strain Type*” caracterizada en individuos de *C. parallelus*.

**Cpe:** *Chorthippus parallelus erythropus*.

**Cpp:** *Chorthippus parallelus parallelus*.

**ET:** “*Electrophoresis type*”.

**FISH:** *Fluorescence in situ hybridization*.

**fbpA:** gen que codifica para la “*fructose-bisphosphate aldolase*”.

**fstZ:** gen que codifica para una proteína involucrada en la división celular bacteriana.

**gatB:** gen que codifica para la “*aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B*”.

**GTR:** modelo “*General Time Reverse*”

**hcpA:** gen que codifica para una proteína cuya función no ha sido caracterizada muy conservada en bacterias, designada por NCBI COG0217

**HKY:** modelo de “Hasegawa, Kishino y Yano”.

**IB:** Inferencia Bayesiana o *Bayesian inference* (BI).

**ICMAT:** Instituto de Ciencias Matemáticas.

**MCMC:** *Markov chain Monte Carlo*.

**ML:** *Maximun Likelihood*, o Máxima Verosimilitud.

**MLEE:** *Multi locus enzyme electrophoresis*.

**MLST:** *Multi locus Strain Typing*.

**OTU:** *Operational Taxonomic Units*.

**PCR:** *Polymerase chain reaction*.

**PCR-DGGE:** *Polymerase chain reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*.

**PFGE:** *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*.

**ST-(X):** *Strain-Type* (siguiendo la nomenclatura recogida en la base de datos

<http://pubmlst.org/wolbachia/>)

**wsp:** gen que codifica para la “*Wolbachia Surface Protein*”



**WCH:** *Whole cell hybridization.*

**ZH:** Zona Híbrida.



# RESUMEN

*Wolbachia* es una alfa-proteobacteria intracelular obligada que afecta a artrópodos y nematodos. Hay numerosos estudios que indican la posibilidad de que *Wolbachia* esté implicada en procesos de especiación, debido a las alteraciones reproductivas que puede causar en el hospedador, principalmente la incompatibilidad citoplasmática. Recientemente, han sido detectados dos supergrupos (B y F) de *Wolbachia* en la zona híbrida pirenaica de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera), planteándose como un nuevo factor involucrado en su dinámica. A su vez, se ha confirmado que este endosimbionte induce incompatibilidad citoplasmática unidireccional y bidireccional en este hospedador.

El presente trabajo nace de la necesidad de valorar la diversidad de la infección por esta bacteria. Se observan diferencias relevantes en las frecuencias de infección en distintas poblaciones de *C. parallelus*, atendiendo a su localización geográfica, lo que nos sirve para confirmar y discutir la distribución de la infección en el continente europeo. De forma global pueden mantenerse los patrones propuestos previamente, observándose una transición a lo largo de la zona híbrida entre las poblaciones francesas, con bajas tasas de infección (y en su caso infectadas por el supergrupo B de *Wolbachia*), y las poblaciones ibéricas, altamente infectadas por el supergrupo F. La población híbrida pirenaica de Sallent de Gállego presenta, como se había descrito, niveles de coinfección muy altos y aparentemente estables a corto plazo. Sin embargo, disponemos de nuevos datos que ajustan este escenario, detectándose una alta divergencia entre, por ejemplo, las poblaciones del centro de la Península Ibérica y aquellas analizadas en su cornisa Cantábrica. A su vez, cabe destacar la presencia de altas frecuencias de infección por el supergrupo F en poblaciones del norte de Inglaterra, así como en la región de Eslovenia.

Se ha comprobado que la infección por *Wolbachia* puede variar en su frecuencia a lo largo del ciclo de vida de *C. parallelus*. En concreto, se observó una reducción en los niveles de coinfección en los machos en la población de Navafría (Sistema Central). Existen múltiples causas que podrían explicar esta reducción, incluidos factores ambientales como la temperatura, como proponemos. Las implicaciones de este hecho en la dinámica de la infección han sido analizadas mediante simulaciones matemáticas, comprobándose que una disminución recurrente de la coinfección puede suponer cambios notables en las frecuencias de infección a largo plazo.



A su vez, nos planteamos analizar la variabilidad intrínseca de la bacteria, empleando para ello un "Sistema de Clasificación Multi-locus" (MLST) que nos permite determinar las distintas cepas de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus*, así como su distribución geográfica. Se observa una relación estable entre determinadas cepas y cada una de las subespecies de este ortóptero. Este análisis a su vez nos permite postular un escenario plausible para el comienzo de la infección en *C. parallelus*. De este modo, se propone un origen antiguo de la infección por el supergrupo F de esta bacteria, que habría co-divergido con su hospedador, frente a un origen más reciente del supergrupo B; una infección *de novo* posiblemente mediada por eventos de transmisión horizontal, en este último caso.

Por otro lado, hemos analizado la diversidad de las comunidades bacterianas en la gónada de *C. parallelus*, detectando un nuevo endosimbionte, *Spiroplasma*, asociado de forma recurrente a este ortóptero. Dicha especie bacteriana no modifica la reproducción de *C. parallelus*, al menos de forma evidente, y no parece condicionar las frecuencias de *Wolbachia* en las distintas poblaciones. Este hecho es relevante de cara a la interpretación de los efectos de *Wolbachia* en la reproducción de este ortóptero, y su influencia en la zona híbrida.

Empleándose técnicas como la *Whole Cell Hybridization* determinamos la localización de la infección por los distintos endosimbiontes de este saltamontes en diferentes tejidos. Esto nos permitió confirmar su distribución citoplasmática, y nos aportó información espacial acerca de la distribución de *Wolbachia* a lo largo de la meiosis en los machos. Los datos confirmaron las observaciones previas en otros modelos experimentales.

Finalmente nos planteamos el análisis de nuevos parámetros que pueden afectar a la dinámica de la infección por *Wolbachia*, valorando la importancia que puedan tener en ésta los fenómenos de transmisión horizontal entre taxones. Para ello se analizó y comprobó la infección por esta bacteria de dos parasitoides asociados a *C. parallelus*: una especie de tachínido (Diptera), así como un nematomorfo.



# ABSTRACT

*Wolbachia* is an obligated intracellular alpha-proteobacteria infecting arthropods and Nematodes. Several studies suggest that *Wolbachia* could be implicated in speciation processes, because of its capacity to alter the reproduction of their hosts, mainly by inducing cytoplasmic incompatibility. Recently, two *Wolbachia* supergroups (F and B) infecting *Chorthippus parallelus* (Orthoptera) were detected. Furthermore, these bacteria induce unidirectional and bidirectional cytoplasmic incompatibilities in this host. For these reasons, we propose that *Wolbachia* should be taken into account as a new factor affecting the dynamics of the *C. parallelus* hybrid zone.

This thesis therefore investigates the genetic diversity of *Wolbachia* infecting *C. parallelus*. We report significant differences in *Wolbachia* infection frequencies among *C. parallelus* populations. These data allow us to confirm and clarify the distribution of *Wolbachia* infection in Europe, and support previous studies describing an infection gradient between northern (low infection by B *Wolbachia*) and southern populations (high infection by F *Wolbachia*) across the hybrid zone. We also report a high degree of co-infection by F and B strains in the hybrid, Pyrenean population of Sallent de Gállego, which seems to be stable across the generations studied. The new data also show differences in infection levels of the central and northern populations of the Iberian Peninsula, and high levels of F *Wolbachia* in the north of England, and Slovenia.

We have tested whether *Wolbachia* infection frequencies vary through the life cycle of *C. parallelus*. In particular, we detected a reduction in coinfection level with the age of males in Navafría, a population in the Sistema Central of the Iberian Peninsula. There are several possible explanations for this decline, including environmental factors specific to this population, which might include the higher temperature. The long-term effect of this reduction in coinfection was analysed by mathematical modelling. We conclude that this new factor can notably influence the dynamic of the infection.

We analysed the genetic variability of the *Wolbachia*, using the “Multi-Locus Strain Typing System” (MLST). This methodology allows us to distinguish the different strains infecting *C. parallelus* and their geographic distribution. We report a stable association between certain strains of *Wolbachia* and the two subspecies of this grasshopper. This result serves to imply a plausible scenario for the origin of this bacterial infection. We propose an ancient origin of the F supergroup, co-diverging with their hosts. By contrast, B supergroup infection could be more recent, possibly by horizontal transmission from other species.



We have analysed the diversity of bacterial communities in *C. parallelus* gonads. In addition to *Wolbachia*, we have detected a new endosymbiont, *Spiroplasma*. This bacterium does not appear to affect the reproduction of *C. parallelus* nor interfere with *Wolbachia* frequencies. This result is relevant, because it means that *Spiroplasma* infection does not modify our previous interpretation of *Wolbachia*-induced reproductive alterations in *C. parallelus* and their influence in the hybrid zone.

*Whole Cell Hybridization* was used to localize endosymbiont infections in different tissues of the grasshopper. This technique allows us to confirm the cytoplasmic distribution of *Wolbachia* and other endosymbionts, and to follow the change in distribution of *Wolbachia* during male meiosis. These changes are consistent with previous studies in other animal models.

Finally, we analysed a new parameter that can affect *Wolbachia*'s infection dynamics: horizontal transmission between taxa. We studied *Wolbachia* infection in two kinds of parasitoids of *C. parallelus*: Tachinidae (Diptera) and a species belong to Nematomorpha Phylum.





# INTRODUCCIÓN.

## 1 EL CONCEPTO DE ESPECIE (O POR QUÉ NO EXISTE UNA DEFINICIÓN SATISFACTORIA).

El concepto de especie es, sin duda, el primer eslabón en el estudio de los procesos de especiación, entendida ésta como el proceso por el cual una especie se divide en dos o más especies (Mayr, 1942; Mayr, 1963; White, 1978). Sin embargo definir qué es una especie, no es obvio.

El concepto tipológico de especie, basado en la morfología, ha sido sustituido por lo que conocemos como “concepto biológico de especie”, entendida ésta como un “grupo de organismos que comparten un acervo genético único mediante relaciones poblacionales” (Mayr, 1942; Mayr, 1963; Fontdevila, 2012). En este sentido, quizás la definición más común es la propuesta por Mayr (1942), quien definió a la especie como “grupos de poblaciones naturales que se cruzan, de manera real o potencial, entre sí, aisladas reproductivamente de otros grupos análogos”. Esta definición estricta de especie, no contempla el proceso de hibridación. Desde luego también lo limita la definición propuesta por Dobzhansky (1937): “Las poblaciones mendelianas se han integrado en conjuntos, dentro de los cuales es posible la hibridación, pero entre los cuales se limita o se elimina por completo. Estos complejos son las especies biológicas”.

De ahí la necesidad de definiciones más abiertas, como la sugerida por Mallet (1995): “Una especie es un grupo de individuos distinguible (morfológicamente o genéticamente) y que da lugar a escasos o nulos descendientes intermedios cuando entran en contacto”, o la planteada por Coyne & Orr, (2004) por la cual se abre la posibilidad de que exista un cierto grado de flujo génico entre especies “las especies distintas se caracterizan por un aislamiento reproductivo amplio, aunque no necesariamente completo”.

Estas definiciones abren un nuevo problema, entendido como “en qué momento durante el proceso de especiación una especie empieza a ser especie”, también conocido como el concepto de “especie real” o “buena especie” (“*good species*”). Sin embargo este es un problema humano de definición, que intenta compartimentalizar un proceso continuo. De ahí que durante este texto, y salvo para referirnos a las subespecies puras de nuestro organismo modelo, *Chorthippus parallelus*, se hable de poblaciones, taxones, grupos y subgrupos, y de



forma genérica, de híbridos, al no poderse definirse de forma estricta los límites entre “subespecies”.

Por otro lado, de las distintas definiciones de especie, existen pocas que puedan considerarse universales. Por ejemplo, la problemática existente para consensuar una definición de especie tiene otra vertiente a la hora de analizar la diversidad de los procariotas (para una revisión ver Konstantinidis *et al.*, 2006; Staley, 2006; Staley, 2009). Tradicionalmente se han usado varios criterios complementarios para definir qué es una especie dentro de este grupo de organismos (Vandamme *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 2002), entre ellos el porcentaje de hibridación del ADN (*DNA–DNA hybridization* o DDH) (Wayne *et al.*), considerándose una especie *aquellos organismos entre los que exista una hibridación superior al 70%* (lo que no significa similitud del 70%, sino una eficiencia en la hibridación del 70%). De hecho estudios recientes equiparan esta metodología con un *95% de identidad nucleotídica* en su genoma o ANI (*Average Nucleotide Identity*) (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos permitió definir nuevos criterios, más fáciles de implementar. El gen *16S rRNA* se convirtió en un estándar para la clasificación de las especies, y de hecho el *Bergey’s manual of systematic bacteriology* comenzó a utilizar este criterio ([www.bergeys.org](http://www.bergeys.org)). Se establecieron valores del *97% de identidad* para el *gen16S rRNA* para clasificar organismos dentro de una misma especie, aunque posteriormente se plantearon criterios más estrictos, del 99% (Keswaniã & Whitman, 2001).

Este es el origen del concepto filogenético de especie (Hull, 1997) o filo-genómico (Staley, 2006), entendido como aquel que permite “*definir a los organismos como miembros de una misma especie en función de su identidad genómica y de las relaciones evolutivas entre ellos*”. La ventaja principal de esta definición es su universalidad potencial. Un ejemplo de la aplicación de esta definición, como veremos más adelante, será la aplicación de Sistemas de Clasificación Multi-Locus (MLST) (Maiden *et al.*, 1998) para la caracterización de *clusters* bacterianos relacionados entre sí. El principal problema de esta definición es que requiere de un conocimiento de la historia evolutiva de los organismos. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la evolución de los procariotas es muy limitado. Por ejemplo, procesos bien caracterizados en eucariotas como la especiación alopátrica (entendida como la formación de dos o mas especies, en este caso bacterianas, en zonas separadas geográficamente de una misma especie ancestral, ver siguiente sección), es un fenómeno controvertido en Microbiología por la dificultad de encontrar evidencias que avalen este aislamiento geográfico (Reno *et al.*, 2009). Otros fenómenos como la transferencia horizontal de genes, la recombinación entre cepas



bacterianas lejanas, la conjugación, etc., hacen que una definición aparentemente sencilla, como la definición filo-genómica de especie, pueda ser más compleja de lo esperado (Staley, 2009).

Un punto interesante es la importancia de la definición de especie en los procesos de simbiosis. Existen múltiples casos descritos en los que se ha observado la co-evolución entre hospedadores y simbiositos (Moran, 2007; Moran *et al.*, 2008). Sin embargo la frecuencia de este fenómeno se puede ver sesgado por el escaso conocimiento sobre la diversidad de los endosimbiontes (¿diferentes especies?) que infectan/conviven en diferentes especies de hospedadores. Concretamente, este es el caso del endosimbionte *Buchnera aphidicola*, donde una única “especie” bacteriana (pese a la existencia y caracterización de múltiples cepas), infecta diferentes especies de pulgones (van Ham *et al.*, 2003). También podría ser el caso de *Wolbachia* sp., género bacteriano de endosimbiontes que infectan a numerosas especies de insectos (ver apartado “*Wolbachia*”, pág. 22). Pese a que ha sido descrita una gran diversidad, la definición de especie bacteriana es también difusa, hablándose en todo caso de supergrupos, cepas y nomenclaturas alternativas (Werren *et al.*, 2008). De ahí la importancia de un criterio común de caracterización que permita una descripción completa de la diversidad bacteriana, y una definición de especie estándar también en el caso de las bacterias.

## **2 ESPECIACIÓN Y BARRERAS REPRODUCTIVAS.**

El proceso de especiación puede ser entendido como la escisión de una especie en otras dos o más (Mayr, 1942; Mayr, 1963; White, 1978).

Hasta hace unas décadas el proceso de especiación iba generalmente ligado a la existencia de una barrera física que separara y aislara poblaciones de una misma especie, permitiendo su divergencia genética (especiación alopátrica) (Mayr, 1942). Sin embargo, las nuevas evidencias nos permiten describir otros escenarios posibles en los cuales esta divergencia entre poblaciones puede y de hecho ha sucedido.

La divergencia en simpatría, como el escenario opuesto en el cual dos poblaciones pueden divergir en ausencia de barreras geográficas, ha dejado de ser un modelo teórico, existiendo evidencias (pese a la polémica) de que efectivamente puede ocurrir en la naturaleza (Linn *et al.*, 2004; Barluenga *et al.*, 2006; Rolán-Alvarez, 2007; Johannesson *et al.*, 2010). Bajo determinadas condiciones el polimorfismo generado por la selección disruptiva puede ser estable en la población (por ejemplo si existe una selección de hábitat diferencial, adaptación ecológica o selección sexual diversificadora...), lo que puede suponer una reducción progresiva del flujo génico entre las poblaciones sin necesidad de que exista una separación geográfica.



A su vez, los nuevos datos apoyan que ambos escenarios deban ser entendidos como los extremos de un gradiente continuo en el que pueden estar involucrados distintos procesos y mecanismos de forma simultánea (ver Fig. 1). De hecho, en los últimos años están resurgiendo viejas polémicas, alimentadas por la cada vez mayor cantidad de datos genómicos y ecológicos. Es el ejemplo de la “*especiación por hibridación*”, considerada hasta hace poco tiempo una idea absurda y excéntrica en muchos ámbitos, y que en los últimos años ha suscitado gran interés y controversia (Mallet, 2005; Mallet, 2007; Abbott *et al.*, 2013).

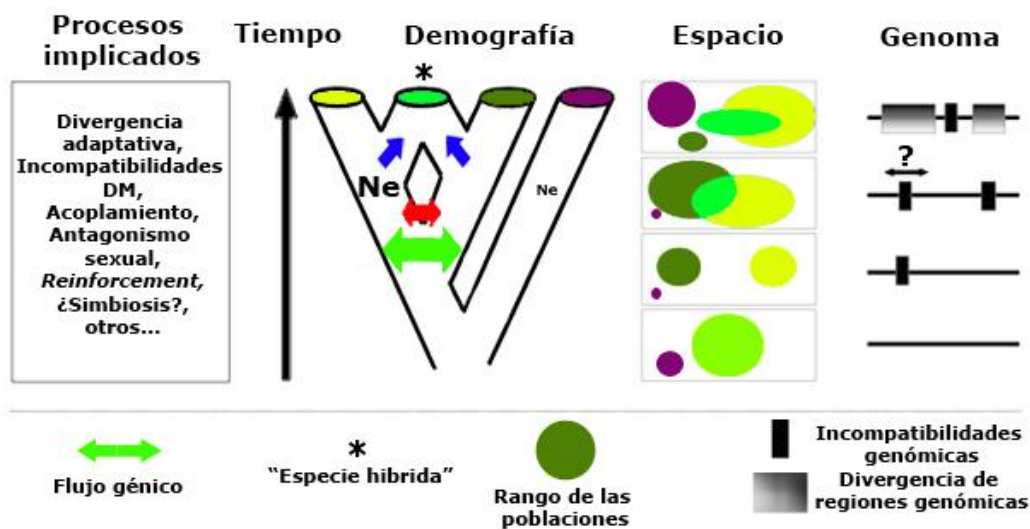


Fig. 1: Modificado de Abbott *et al.*, (2013). El proceso de especiación en un proceso complejo, multifactorial, que debe ser entendido en un contexto espacial y temporal. Las poblaciones están sometidas a procesos demográficos y se redistribuyen constantemente en un espacio cambiante, donde pueden surgir nuevas oportunidades ecológicas, permitiendo a las especies ocupar nuevos nichos. A su vez, debe considerarse la sucesión de periodos de aislamiento geográfico entre poblaciones, seguidas de periodos en los que el flujo génico es posible. Esto hace posible que en el proceso de especiación se vean involucrados múltiples mecanismos. Desde una perspectiva genética, la aparición de *loci* incompatibles puede favorecer la reducción del flujo génico entre poblaciones y la divergencia de los genomas. La acumulación gradual de diferencias favorecerá el proceso de especiación, mientras que la introgresión de caracteres limita esta divergencia. A su vez, la generación de híbridos puede dar lugar a novedades evolutivas y, potencialmente, a nuevos taxones. “ $N_e$ ” indica el tamaño efectivo de la población. “Incompatibilidades DM” se refiere a Incompatibilidades Dobzhansky-Müller.

La hibridación es un fenómeno frecuente en la naturaleza (Mallet, 2005) y capaz de generar novedad evolutiva (Whitney *et al.*, 2010; Kunte *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha observado que la capacidad de adaptación de las variantes híbridas en los girasoles puede favorecer su capacidad de invadir nuevos ambientes (Strasburg, 2001; Rieseberg & Blackman, 2010). Por otro lado, el contacto con las poblaciones parentales favorece a su vez nuevos

procesos de hibridación, dando lugar a complejos fenómenos de retroalimentación que pueden favorecer la diversificación (Seehausen, 2004).

El proceso por el cual la hibridación entre dos taxones puede desembocar en la aparición de un tercer taxón había sido propuesta principalmente en plantas, donde la especiación híbrida por aloploidía (por la cual una duplicación del complemento cromosómico restablece la meiosis de los individuos híbridos, y los hace fértiles) es un fenómeno relativamente bien conocido (Soltis & Soltis, 2009). La especiación híbrida por homoploidía (en la cual no se produce una duplicación cromosómica) ha sido también descrita en plantas y animales. Un ejemplo puede ser el caso de la mariposa *Heliconius*, donde los nuevos datos genéticos respaldan el papel de la hibridación en los procesos de radiación adaptativa (*Heliconius-consortium*, 2012). Sin embargo la prueba más evidente para demostrar el papel de la hibridación en la especiación es relacionar de forma directa las nuevas combinaciones híbridas con las barreras al flujo génico. En este sentido es interesante el trabajo de Schwarz *et al.*, (2007) sobre el origen híbrido de la mosca *Lonicera* sp. Los nuevos datos genómicos aportarán en los próximos años nuevos datos sobre la importancia de este fenómeno en el proceso de especiación (Abbott *et al.*, 2013).

## **2.1 Barreras al flujo génico.**

Independientemente de la nomenclatura empleada y el caso concreto, el proceso de especiación requiere del establecimiento de barreras reproductivas (que no tienen que ser necesariamente geográficas, ni totales). Existen varios tipos de barreras reproductivas:

- (i) Barreras de aislamiento pre-zigótico previas al apareamiento. Son aquellas barreras que se establecen antes de que exista una transferencia del gameto masculino entre el macho de una población y la hembra de otra. Un ejemplo de este tipo de barreras serían las preferencias en la selección de pareja, diferencias en los rituales de cortejo (Maan & Seehausen, 2011) o las diferencias en el periodo de floración (Izawa, 2007).
- (ii) Barreras de aislamiento pre-zigótico tras al apareamiento. Por ejemplo, en aquellos casos donde no se produce la fecundación debido a las incompatibilidades entre los gametos (Palumbi, 2008), competición espermática (Bella *et al.*, 1992; Cordes *et al.*, 2013) o incluso cuando el apareamiento no es exitoso debido a diferencias morfológicas en los órganos sexuales (Eberhard, 1994; Wojcieszek & Simmons, 2013).
- (iii) Barreras de aislamiento post-zigótico. Aquellos casos en los que aunque se produce la fecundación, el descendiente no llega al estadio adulto y si llega, no deja progenie



debido a su esterilidad. Con ello englobamos múltiples tipos de incompatibilidades genéticas, cuyos mecanismos son aun poco conocidos (Wu & Ting, 2004a; Orr, 2005; Koevoets & Beukeboom, 2008; Presgraves, 2010; Nosil & Schluter, 2011). El modelo Dobzhansky-Muller es uno de los marcos teóricos para su estudio (ver sección “El modelo de Dobzhansky-Muller”, pág. 15) (Dobzhansky, 1937; Muller, 1939). Se han descrito incompatibilidades genéticas relacionadas con las interacciones epistáticas entre múltiples *loci*, incluidas aquellas interacciones entre *loci* nucleares (Maheshwari & Barbash, 2011), y aquellas que involucran a *loci* nucleares y mitocondriales (Burton & Barreto, 2012; Luo *et al.*, 2013). Aunque generalmente los fundamentos moleculares se desconocen, existen algunos casos en los que este tipo de interacciones han comenzado a comprenderse (Meiklejohn *et al.*, 2013). El caso de la incompatibilidad citoplasmática provocada por determinados endosimbiontes, como por ejemplo *Wolbachia*, y que supone la muerte embrionaria, también puede considerarse una barrera post-zigótica (ver apartado “*Wolbachia*”, pág. 22) (Flor *et al.*, 2007).

Pese a esta clasificación, en ocasiones estos mecanismos no puedan considerarse completamente separados unos de otros. Por ejemplo, el aislamiento post-zigótico puede favorecer la aparición de mecanismos pre-zigóticos, mediante *reinforcement* o reforzamiento (Ortiz-Barrientos *et al.*, 2004; Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009). Como consecuencia del menor *fitness* o eficacia biológica de los individuos intermedios o híbridos, aquellos comportamientos que permitan a las hembras seleccionar de forma preferencial a una pareja perteneciente a la misma población, respecto a los machos de otra, se verán *reforzados*, favoreciéndose la divergencia progresiva de los taxones (Tregenza & Wedell, 2000; Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009; Bimova *et al.*, 2011; Abbott *et al.*, 2013). Un caso peculiar, y del que hablaremos más adelante, es el papel de los endosimbiontes en el *reinforcement* (Telschow *et al.*, 2005a; Jaenike *et al.*, 2006).

### **3 LAS ZONAS HÍBRIDAS COMO COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS PROCESOS DE ESPECIACIÓN.**

Mayr (1942) define como híbrido a la descendencia de individuos de diferentes familias, géneros o especies (aunque cuestiona si debe considerarse híbrida la descendencia entre diferentes subespecies). Dado que como hemos visto el concepto de especie puede ser controvertido, definiremos a los híbridos como a aquella descendencia fruto del cruzamiento



entre individuos de dos poblaciones, o grupos de poblaciones, discernibles por uno o varios caracteres hereditarios, según las definiciones de Mallet (1986) y Harrison (1990). Por tanto, las zonas híbridas serán *“aquellas regiones en las que individuos de dos poblaciones, o grupos de poblaciones discernibles por uno o varios caracteres hereditarios, se encuentran, se cruzan y dan lugar a descendencia híbrida”* (Barton & Hewitt, 1985).

En este sentido, las zonas híbridas surgen en zonas de contacto entre poblaciones divergentes. En el caso de las zonas híbridas primarias, las poblaciones parentales habrían permanecido en contacto durante su divergencia mientras que en las zonas híbridas secundarias, las poblaciones parentales habrían divergido en alopatría y habrían entrado en contacto tras la divergencia (contacto secundario) (Mayr, 1942). La distinción entre ambos escenarios es difícil de discernir en base a la distribución actual de los caracteres y suele requerir del conocimiento de la historia evolutiva de la especie (Endler, 1982). Múltiples zonas híbridas que afectan a especies en latitudes templadas, han sido explicadas por contacto secundario (Hewitt, 2000; Hewitt, 2001; Hewitt, 2011). Estas especies no habrían podido ocupar sus hábitats actuales durante la última glaciación, quedando restringida su distribución a refugios aislados donde habrían divergido genéticamente en alopatría. Posteriormente, la retirada de los hielos habría permitido el contacto secundario entre poblaciones parcialmente divergentes. Por otro lado, pese a la reticencia de Endler (1982), Hewitt y Barton (1981) propusieron que la existencia de cambios concordantes en múltiples caracteres, podía ser indicativo del origen por contacto secundario de una zona híbrida.

### **3.1 El interés de las zonas híbridas, como laboratorios naturales.**

Las zonas híbridas, definidas como *“aquellas regiones geográficas donde dos taxones convergen, se cruzan y dan lugar a descendencia híbrida”*, han sido consideradas como *“laboratorios naturales para el estudio de los agentes evolutivos, las barreras de flujo genético y el proceso de divergencia genética entre los taxones implicados”* (Barton & Hewitt, 1985; Hewitt, 1988).

En primer lugar porque nos permiten profundizar en el concepto de especie, mostrándonos poblaciones parcialmente diferenciadas pero que se mantienen en equilibrio. Esto es, existe una reducción del flujo genético, pero esto no implica una separación completa entre poblaciones. En segundo lugar porque el amplio rango de genotipos observados en las zonas híbridas pueden permitirnos analizar la diferenciación genética y las fuerzas selectivas involucradas en el proceso de especiación (Barton & Hewitt, 1985). En tercer lugar, y a la vista de

los nuevos datos genómicos y ecológicos disponibles, las zonas híbridas se podrían plantear como laboratorios naturales, en los que pueden surgir nuevas combinaciones genómicas: nuevos taxones (Mallet, 2007; Abbott *et al.*, 2013).

### 3.2 Clinas.

Con el término “clina”, nos referimos a un gradiente a lo largo de la zona híbrida para alguno de los caracteres que nos permiten distinguir a las poblaciones parentales. Este gradiente puede abarcar unos cuantos metros, o cientos de kilómetros (Barton & Hewitt, 1985).

En general el término clina se considera sinónimo de zona híbrida, sin embargo algunos autores restringen el uso de zona híbrida a aquellas clinas muy estrechas o clinas que involucran a muchos caracteres coincidentes (Bigelow, 1965; White *et al.*, 1982). Las clinas pueden clasificarse en dos tipos, aquellas que se mantienen por la selección y en las que la dispersión de los organismos se considera despreciable (o clinas independientes de dispersión), y aquellas en las que el efecto homogeneizador de la dispersión se contrapone con la selección (clinias dependientes de selección).

El primer caso queda reflejado en el modelo de *superioridad híbrida limitada* defendido por Moore (1977), en el que los híbridos poseen una mayor valor adaptativo que los parentales. El segundo caso incluiría el *modelo ecotonal* o *zonas híbridas mosaico*, en el que las dos formas parentales están adaptadas a hábitat diferentes, y el modelo de *zonas de tensión*, que engloba los casos de selección dependiente de frecuencia (Mallet, 1986) y la inferioridad híbrida (Barton & Hewitt, 1985). Barton y Hewitt (1985) defienden que gran parte de las zonas híbridas pueden explicarse como zonas de tensión, en las cuales los híbridos presentan un menor *fitness* o valor adaptativo que las formas parentales. Un ejemplo de zona de tensión puede ser el caso del ortóptero *Podisma pedestris* (Barton & Hewitt, 1981). También la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* ha sido descrita como tal, fundamentalmente debido a que los híbridos macho F1 obtenidos en laboratorio son estériles. Sin embargo, debemos reseñar que tras años de hibridación, en la naturaleza estos organismos son fértiles (Shuker *et al.*, 2005a; Shuker *et al.*, 2005b).

Las clinas pueden desplazarse hasta encontrar una posición de equilibrio, dando lugar a un fenómeno denominado acoplamiento de clinas (o *coupling*) (Bierne *et al.*, 2011). De hecho estos autores defienden la posibilidad de que muchas de las zonas híbridas descritas en base a gradientes ambientales, sean realmente una consecuencia de este proceso de acoplamiento que incluso supondría el acoplamiento entre factores endógenos y exógenos (*The coupling*





*hypothesis*). En este sentido, las clinas pueden ser coincidentes (cuando su centro está en la misma posición) y/o concordantes (cuya anchura es similar). La coincidencia de varias clinas ha sido propuesta como una característica que permite distinguir zonas de contacto secundario, dado que sería difícil que la selección, actuando de forma independiente, permitiera esta coincidencia (Barton & Hewitt, 1985). Por otra parte, la coincidencia de clina permitiría la interacción entre distintas barreras al flujo génico, limitando éste entre las poblaciones parentales (Slatkin, 1975; Key, 1981; Hilgenboecker *et al.*, 2009).

### 3.3 El modelo de Dobzhansky-Muller.

El modelo de Dobzhansky-Muller (DM) permite describir las incompatibilidades genómicas que entran en juego en un contacto secundario.

El modelo, que considera 2 *loci*, propone un escenario en el cual dos poblaciones, que permanecen separadas durante un tiempo, divergen en alopatría. Se asume que durante esta divergencia surgirán en cada población alelos nuevos (fijados por deriva o por selección), y al restablecerse el contacto (contacto secundario) la incompatibilidad entre estos nuevos alelos dará lugar a un menor *fitness* en los híbridos. La principal característica del modelo DM es que al considerar dos *loci*, permite conectar ambas poblaciones ancestrales mediante genotipos híbridos funcionales (aquellos que poseen un único alelo derivado), que evitan el “valle adaptativo” propuesto, esto es la reducción del *fitness* provocado por las incompatibilidades (que sólo se observa en los individuos que poseen los dos alelos derivados, entre los cuales existe incompatibilidad) (Fig. 2 y Fig. 3), pero no entre los dos alelos ancestrales o entre estos y uno de los alelos derivados.

En general, se suele asumir que las incompatibilidades son asimétricas tras el contacto secundario, esto es A y B son compatibles, pero a y b son incompatibles (ver Fig. 2 y Fig. 3). Sin embargo se supone que durante el proceso la acumulación de otras diferencias implicará que estas incompatibilidades tiendan a ser simétricas. Bajo estas condiciones, Gavrilets (1997) comprobó que las zonas híbridas podrían ser estables siempre y cuando no se sobrepasase cierta tasa de migración efectiva. Esta migración efectiva era un reflejo del flujo génico entre las dos poblaciones parentales, y este límite queda establecido cuando la migración permita un flujo génico similar al que se produciría en un modelo sin incompatibilidades.

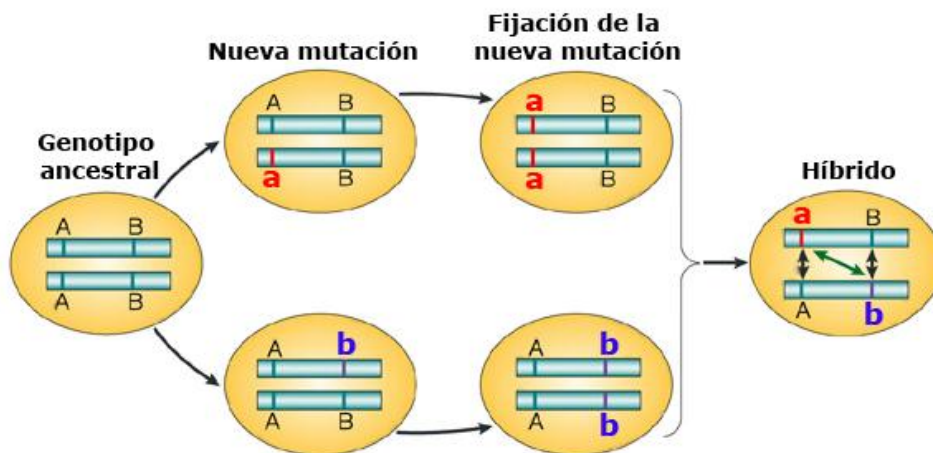


Fig. 2: Modificado de Wu & Ting (2004): Esquema mostrando la fundamentación del modelo Dobzhansky-Muller (DM) de incompatibilidad híbrida. En una población ancestral, el genotipo es  $AABB$ . Cuando la población se escinde “A” cambia a “a” en una de las poblaciones, mientras que en la otra “B” cambia a “b”. “a” y “b” son incompatibles. Como no existe interacción entre ambos alelos en la población ancestral, la evolución de la incompatibilidad se hace posible. En la población híbrida la incompatibilidad entre los alelos se indica con una flecha verde. El modelo DM no trata de explicar el proceso por el cual la divergencia ocurre, sino que se centra en su resultado, la incompatibilidad.

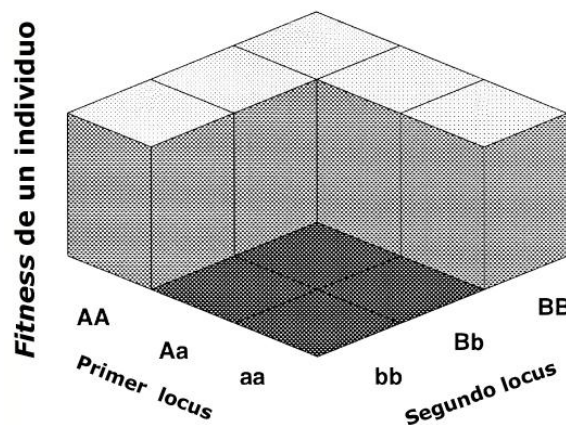


Fig. 3: Modificado de Gavrillets (2003). Espacios adaptativos en el modelo DM en organismos diploides. La altura de las barras indica el *fitness* de una determinada combinación de genes. La presencia de los alelos  $a$  y  $b$  (incompatibles, ver Fig. 2) en un mismo individuo da lugar a una viabilidad cero. El resto de combinaciones génicas son compatibles y tendrán un *fitness* determinado. El modelo DM asume que este *fitness* es igual en todos los casos compatibles, pero en un escenario real esto no tendría por qué ser así.

### 3.4 La regla de Haldane.

La regla de Haldane hace referencia a la observación empírica por la cual “cuando en la descendencia entre dos razas animales uno de los sexos no aparece, es raro o estéril, este sexo es el heterogamético” (Haldane, 1922). Esta asimetría en las disfunciones de los híbridos, dependiente de sexo, afecta a numerosas especies, incluidos insectos, pero también mamíferos y aves (Coyne, 1992), y sus bases genéticas no están claras (Coyne, 1985; Orr, 1993; Naisbit *et al.*, 2002; Brothers & Delph, 2010; Schilthuize *et al.*, 2011; McDermott & Noor, 2011; Moehring, 2011).

Existen múltiples propuestas para explicar la regla de Haldane, ninguna plenamente satisfactoria, debido a que cada una puede explicar casos concretos, pero no permite su generalización. Quizás porque se trate de mecanismos complejos, y diferentes en función del determinismo sexual de la especie.

- (i) Teoría de la dominancia, propuesta por Muller (1942): Esta hipótesis trata de explicar la regla de Haldane (basándose en el modelo DM) por la incompatibilidad generada entre un alelo ligado al cromosoma X y un alelo autosómico. Si el alelo ligado al cromosoma X es recesivo, sólo será expresado en los machos (aplicándolo a *Drosophila*). Si esto fuera así, las hembras homocigotas para el gen recesivo debían ser estériles. Sin embargo los experimentos de Coyne (Coyne, 1985), descartaron esta predicción, al menos en *Drosophila* y en los términos planteados por Muller, al demostrar que las hembras con este cromosoma en homocigosis eran fértiles.
- (ii) *Faster-male theory*, propuesta por Wu y Davis (1993): Esta teoría sugiere que los genes que afectan a los híbridos heterogaméticos evolucionarían más rápido que en el caso de los híbridos homogaméticos, lo que explicaría la aparición de incompatibilidades afectando principalmente al primer caso. La teoría a su vez proponía que la inviabilidad y la esterilidad, ambos fenotipos propuestos por la regla de Haldane estarían causados por mecanismos distintos. Sus argumentos se basaban en que los genes que causaban esterilidad dependerían del sexo del individuo, mientras que aquellos que causaban inviabilidad, no. Además se centraba en los genes que causaban esterilidad, dado que la esterilidad del sexo heterogamético es el fenotipo habitual en la regla de Haldane.
- (iii) *Faster-X theory*: según esta teoría los genes ligados al cromosoma X evolucionan más rápido que aquellos asociados a los autosomas (Charlesworth, 1992), hecho

controvertido en especies como *Drosophila* (Orr & Betancourt, 2001; Thornton *et al.*, 2006; Meisel *et al.*, 2012).

- (iv) *Otras teorías:* Se han propuesto otras teorías, incluyendo el papel de “elementos genéticos egoístas” o *meiotic drive alleles* (Frank, 1991; Hurst & Pomiankowski, 1991); reorganizaciones cromosómicas (Haldane, 1932) o incompatibilidades XY (Heikkinen & Lumme, 1998).

#### **4      LA ZONA HÍBRIDA DE *CHORTHIPPUS PARALLELUS*.**

La zona híbrida que *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae) (Zetterstedt, 1821) forma en los Pirineos, constituye, desde los años 80, un modelo de estudio consolidado en el ámbito de la Biología Evolutiva (ver Shuker *et al.*, 2005a para una revisión).

La subespecie *C. parallelus parallelus* (Cpp) se distribuye ampliamente por el continente europeo, siendo sustituida en la Península Ibérica por la subespecie endémica *C. parallelus erythropus* (Cpe). El hábitat de esta especie se restringe a praderas alpinas, por lo que su distribución en la Península Ibérica se limita a poblaciones aisladas, localizadas en sus sistemas montañosos, donde aparece normalmente este tipo de ecotopo. La cornisa cantábrica constituye una excepción, observándose una distribución continua de la especie (Bella *et al.*, 2007). Debido a que el límite altitudinal de este organismo se sitúa en torno a los 2.000 metros, el contacto entre ambas subespecies se restringe a los valles transversales de los Pirineos. Es el caso de la zona híbrida que se forma a lo largo del Valle de Tena, en Huesca y su continuación en “la vallée d'Ossau”, ya en Francia. Así mismo, se han detectado híbridos en el Puerto de la Quillane (Pirineo Oriental) y en el Pirineo Navarro (Butlin & Ritchie, 1991; Hewitt, 1993; Buño *et al.*, 1994).

La actual divergencia entre ambas subespecies, al igual que en numerosas especies de zonas templadas, es consecuencia de la diferenciación alopátrica entre las poblaciones ancestrales que se refugiaron en el sur de Europa durante el último periodo glacial (entre 18.000 y 10.000 años a.e.c.). Los principales refugios y rutas de recolonización están bien establecidas y muestran patrones concordantes en muchas especies (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1999; Hewitt, 2000; Hewitt, 2001; Hewitt, 2011; Waters *et al.*, 2013). Las actuales poblaciones de *C. parallelus* derivan de las poblaciones ancestrales que quedaron presumiblemente aisladas en la Península Ibérica, la Península Itálica y los Balcanes. La retirada de los hielos al final del periodo glacial produciría ciclos sucesivos de recolonización y retroceso mediados por la dinámica de los hielos. Dichos procesos darían lugar a la diversidad que actualmente observamos en las distintas poblaciones peninsulares y en última instancia,



provocarían la formación de la zona híbrida por contacto secundario entre los descendientes de las poblaciones ancestrales ibéricas y los de aquellas que procedían de posiblemente de los Balcanes. Estas últimas serían las responsables de la recolonización de gran parte del continente europeo (Hewitt, 1993; Hewitt, 1996; 1999). Según los datos de pólenes fósiles (Huntley & Birks, 1983) la zona híbrida entre ambas subespecies surgió hace aproximadamente 9.000 años (Hewitt, 1988).

Reconstruir los ciclos de expansión y retracción poblacional que expliquen la actual distribución de *C. parallelus* en la península y la recolonización del continente europeo, presenta gran complejidad. Los estudios realizados respecto a la distribución geográfica actual de muchas especies ibéricas, revelan una alta estructuración de las poblaciones en aquellas especies que quedaron aisladas en la Península Ibérica durante el periodo glacial. Para explicar esta estructuración, se ha propuesto un escenario de “refugios dentro de refugios” a lo ancho de nuestra geografía durante el último periodo glacial, y que con la retirada de los hielos, darían lugar de forma independiente a las actuales poblaciones de origen ibérico (Gomez & Lunt, 2007; Bella *et al.*, 2010). En el caso de *C. parallelus*, estudios basados en el análisis filogeográfico del gen mitocondrial de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa, así como en distintos marcadores nucleares (Lunt *et al.*, 1998) sugieren que las diferencias observadas entre las poblaciones del Sistema Central y el norte de la península podrían deberse a ciclos independientes de expansión desde el sur de la Península (Cooper *et al.*, 1995). Por otro lado, el estudio citogenético de los patrones de heterocromatina constitutiva del cromosoma X en poblaciones de la Península Ibérica (Bella *et al.*, 2007) muestra un patrón común para las poblaciones del centro y sur peninsular, y diferente para las poblaciones del norte peninsular. Esto complementaría las diferencias a nivel nuclear y mitocondrial observadas (Cooper & Hewitt, 1993; Lunt *et al.*, 1998) y apoyaría la hipótesis de expansiones independientes.

Existen múltiples estudios que, desde distintas perspectivas, han tratado de explicar el origen y la actual dinámica de la zona híbrida pirenaica del Col de Portalet (Valle de Tena y vallée d'Ossau). Estos estudios revelan la existencia de clinas a lo largo de un transecto de unos 35 km para distintos marcadores morfológicos, etológicos, cromosómicos y moleculares que diferencian a las dos subespecies de *C. parallelus*. En función de dichos marcadores se pueden observar poblaciones puras de Cpe en el extremo español, individuos con características intermedias entre Cpp y Cpe en la zona central del transecto y poblaciones puras Cpp en el extremo francés. Es precisamente en la zona central del transecto analizado donde se establecen las clinas que reflejan el cambio de las frecuencias de los distintos caracteres especificados anteriormente. La

mayoría de las clinas son coincidentes (Butlin & Hewitt, 1985b; a; Ritchie, 1990; Cooper & Hewitt, 1993; Lunt *et al.*, 1998; Ibrahim *et al.*, 2002).

Si centramos nuestra atención en los marcadores citogenéticos (ver Fig. 4), cabe destacar la existencia de diferencias significativas tanto en la distribución de la heterocromatina constitutiva en el cromosoma X, como en la distribución de los NORs (Regiones Organizadoras del Nucleolo) (Gosalvez *et al.*, 1988; Bella *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1996).

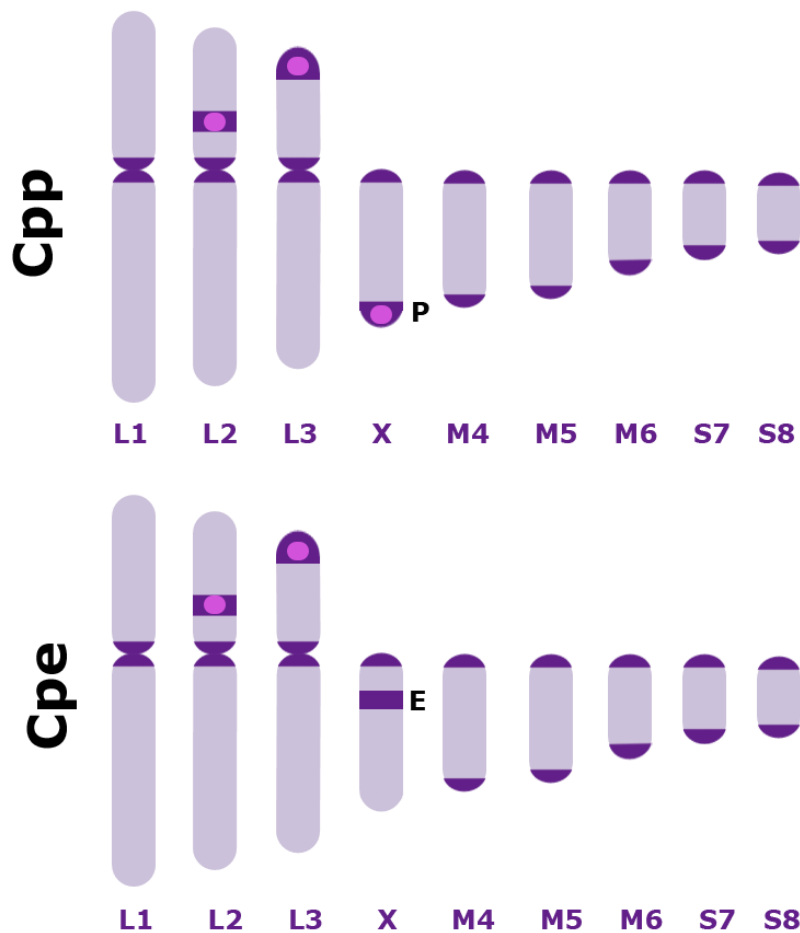


Fig. 4: Complemento cromosómico de las subespecies *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Cpp y Cpe, respectivamente). Los círculos rosas indican la localización de las Regiones Organizadoras del Nucleolo (NORs) activas. La heterocromatina constitutiva, en color morado oscuro, muestra patrones de polimorfismo de presencia-ausencia y de tamaño, destacando la presencia de la banda P en el cromosoma X de Cpp, y la banda E en el cromosoma X de Cpe (imagen construida a partir de la información de Serrano (1994).

El cariotipo de *Chorthippus parallelus* consta de 8 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales, siendo el determinismo sexual XX, para las hembras y XO para los machos, constituyendo estos últimos por tanto el sexo heterogamético. Las diferencias más significativas a nivel cromosómico pueden observarse en la distribución de las bandas de heterocromatina constitutiva en el cromosoma X que caracterizan a ambas subespecies. Los individuos de las poblaciones puras Cpp se distinguen por presentar únicamente una banda de posición distal denominada banda P; a su vez la subespecie Cpe sólo presenta en el cromosoma X una banda propia de posición intersticial subproximal denominada banda E. Finalmente, los híbridos se caracterizarán, bien por presentar cualquiera de las dos bandas anteriores, ambas sobre el mismo cromosoma, o por presentar un tercer patrón caracterizado por una banda subproximal, más alejada del centrómero que la banda E. Esta banda, que se denomina H, aparece únicamente en las poblaciones híbridas, representando un ejemplo de lo que se conoce en este ámbito como “alelos raros”. A lo largo de las poblaciones híbridas, por recombinación entre estos marcadores, aparecen otros morfos (Serrano *et al.*, 1996).

El establecimiento de las clinas para cada uno de estos marcadores nos muestra (Gosalvez *et al.*, 1988; Bella *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1996) (ver Fig. 5):

- (i) Banda E: Una clina suave, indicadora de un marcador neutro.
- (ii) Banda H: Una clina en forma de campana cuyo centro coincide con el resto de clinas.
- (iii) Banda P: Una caída abrupta y no coincidente con ningún otro marcador estudiado. Esto último podría indicar una fuerte selección en contra de la introgresión de la banda P (o de algún *locus* ligado a ella).

Los cruzamientos en el laboratorio entre individuos puros de estas subespecies dan lugar a machos híbridos estériles (cumpliendo con la regla de Haldane) caracterizados por disfunción testicular y alteraciones meióticas (Hewitt *et al.*, 1987; Bella *et al.*, 1990). Sin embargo las hembras F1 son fértiles. Estos resultados, junto con la caracterización de la zona híbrida como zona de contacto secundario, apoyarían la selección en contra de los híbridos. Esto sugiere que la zona híbrida descrita se trate de una zona de tensión (Hewitt *et al.*, 1987). Sin embargo hay que destacar que los cruzamientos de hembras F1 (fértiles) con machos parentales permiten observar machos F2 con menores alteraciones, y que en la naturaleza los híbridos son funcionales (Virdee & Hewitt, 1992; 1994; Shuker *et al.*, 2005a; Shuker *et al.*, 2005b).

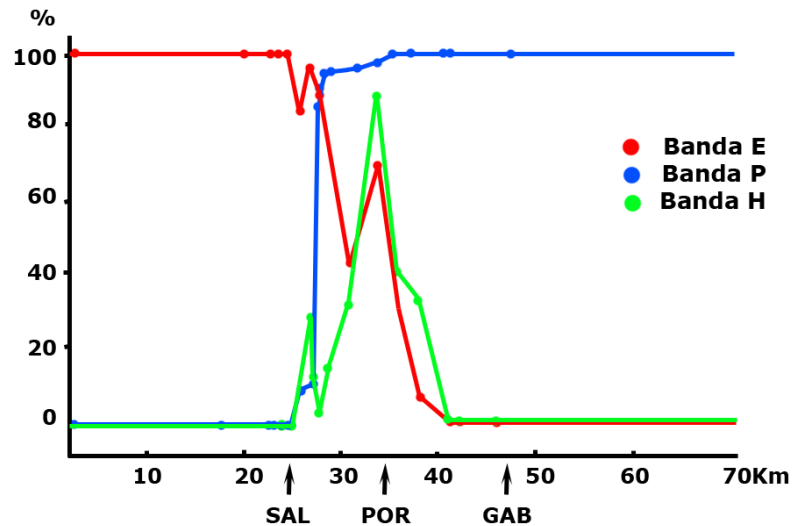


Fig. 5: Modificado de Serrano *et al.*, (1996) Representación del porcentaje de cada banda heterocromática del cromosoma X (E, P y H) en las distintas poblaciones analizadas a lo largo del transecto de la zona híbrida. SAL: Sallent de Gállego, POR: Portalet, GAB: Gabas.

## 5 WOLBACHIA.

### 5.1 ¿Especiación por simbiosis?

En 1927, Wallin hipotetizó sobre la posibilidad de que la adquisición de nuevos endosimbiontes pudiera inducir la divergencia y el origen de nuevas especies. Una idea excéntrica y duramente criticada. Actualmente, la teoría hologenómica, consideraría a los microorganismos como una continuación del genoma de la especie hospedadora (Coyne & Orr, 2004), comprobándose que cambios en la comunidad bacteriana de un hospedador pueden tener consecuencias incluso comportamentales (Sharon *et al.*, 2010). Por otro lado, se han propuestos términos como “especiación por infección” o “especiación por simbiosis” (Wade, 2001; Brucker & Bordenstein, 2012a) que reflejan el papel de las comunidades bacterianas en la evolución de los organismos. Este cambio en el rol asignado a los microorganismos se debe a varios descubrimientos, como resumen Brucker & Bordenstein (2012a):

En primer lugar, sabemos que los procesos de simbiosis son universales en eucariotas, habiéndose descrito una gran diversidad de microorganismos asociados a mamíferos (Qin *et al.*, 2010), insectos (Brucker & Bordenstein, 2012b) y plantas (Hirano & Upper, 2000). En segundo lugar, existe una alta especificidad entre endosimbiontes y hospedadores, teniendo estos primeros roles muy concretos relacionados con la nutrición, el sistema inmune, el desarrollo o la reproducción (McCutcheon *et al.*, 2009; Fraune & Bosch, 2010; Lee & Mazmanian, 2010). En



tercer lugar, conocemos que el sistema inmune de los organismos evoluciona rápidamente en respuesta a estas comunidades bacterianas (Obbard *et al.*, 2009). Por otro lado, en varios casos reconocidos, sabemos que pueden ser la causa de un aislamiento reproductivo entre poblaciones (Werren *et al.*, 2008b). De ahí la necesidad de considerar esta fuente de diversidad en el contexto de la teoría evolutiva (Brucker & Bordenstein, 2012a).

En este sentido, cabe destacar el papel de los estudios realizados sobre el endosimbionte *Wolbachia*. sp. (Rickettsiales): alfa-proteobacteria intracelular obligada que afecta, según las estimaciones, entre un 20% a un 76% de las especies de insectos así como a numerosas especies de otros artrópodos y nematodos. Generalmente, se ha descrito una única especie, *W. pipientis*, pese a la gran divergencia descrita entre cepas bacterianas (Werren, 1997; Jeyaprakash & Hoy, 2000; Hilgenboecker *et al.*, 2008). Debido a las alteraciones reproductivas que causa (ver el apartado siguiente), ha sido propuesta como una posible barrera reproductiva, relacionándosela con el proceso de especiación (para una revisión ver Moran *et al.*, 2008; Serbus *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008; Mercot & Poinot, 2009; Saridaki & Bourtzis, 2010). Su alta incidencia en insectos, junto al enorme número estimado de especies perteneciente a esta clase (ver Fig. 6), ha hecho que la biología de esta bacteria adquiriera un alto interés en la comunidad científica.

## 5.2 Incompatibilidad citoplasmática.

*Wolbachia* induce distintas alteraciones reproductivas en su hospedador, considerándose bien como parásito reproductivo, bien como mutualista en función de esta interacción (Serbus *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008). Dichas alteraciones incluirían procesos de feminización de los machos, la muerte selectiva de éstos, la inducción de partenogénesis en especies no partenogenéticas, y procesos de incompatibilidad citoplasmática (IC).

En este último caso podrían considerarse dos tipos de incompatibilidad: la IC unidireccional se produciría en cruzamientos entre un macho infectado y una hembra no infectada, produciéndose un descenso significativo en la descendencia, que llega incluso a su ausencia completa. Adicionalmente, hablamos de IC bidireccional cuando este descenso en el número de descendientes se produce en cruzamientos en los que intervienen distintas cepas de esta bacteria (Duron & Weill, 2006; Engelstädter & Hurst, 2009).

Esta “especie” bacteriana es muy diversa y se han llegado a proponer hasta 11 supergrupos (Ros *et al.*, 2009), sin embargo, para la clasificación de sus cepas bacterianas se suele tener en cuenta la clasificación en 8 supergrupos, nombrados de la A a la H, en base a diferencias de secuencia del gen *16S rRNA* (Bordenstein *et al.*, 2009). Esta clasificación



taxonómica tiene relevancia debido a las incompatibilidades que se establecen entre supergrupos, e incluso entre cepas distintas. Para ello, se han desarrollado nuevos sistemas de clasificación basados en la utilización simultánea de varios *loci* (ver sección “Sistemas de Clasificación Multilocus: una aproximación a la identificación de clones bacterianos.”, pág. 32).

La incompatibilidad citoplasmática ha sido explicada mediante un modelo de *modificación y rescate* o sus variantes (Werren *et al.*, 2008; Bossan *et al.*, 2011). Según esto, el número de descendientes se reduciría (o incluso no habría descendientes) en aquellos cruzamientos entre machos infectados, cuyo esperma estaría “modificado” y las hembras no infectadas, incapaces de rescatar dicha “modificación” (Werren *et al.*, 2008). Sin embargo, si la hembra estuviera infectada, sería capaz de “rescatar” la “modificación” y el cruzamiento daría lugar a descendencia.

Los mecanismos moleculares de la incompatibilidad citoplasmática no están claros. Se ha propuesto que la presencia de *Wolbachia* modifica el normal desarrollo de la espermatogénesis mediante proteínas de secreción tipo IV, asociadas a la cromatina (Rances *et al.*, 2008). Estas alterarían distintas proteínas reguladoras del ciclo celular tras la fecundación y afectarían a una descondensación aberrante del pronúcleo masculino y/o una pérdida de los cromosomas paternos (Reed & Werren, 1995; Lassy & Karr, 1996; Callaini *et al.*, 1997; Tram & Sullivan, 2002). También se ha observado que la IC modifica el número de profases y metafases en el pronúcleo masculino, y se ha relacionado con problemas en la segregación cromosómica (Tram *et al.*, 2006). A su vez un estudio reciente observó un retraso en la sustitución de las protaminas por las histonas H3.3 y H4, una retención del factor de replicación PCNA durante la metafases del pronúcleo masculino, y alteraciones en la activación de la ciclina Cdk1 y lo que podría provocar los problemas de descondensación y segregación previamente notificados (Landmann *et al.*, 2009). Esto provocaría la muerte del cigoto en organismos diploides al verse afectadas las primeras mitosis del *zigoto* tras la fertilización (Werren *et al.*, 2008). Se han obtenido evidencias indirectas de esta modificación de la cromatina en los machos infectados por *Wolbachia* en el ortóptero objeto de esta tesis, *C. parallelus*, en donde se ha observado la influencia de la infección en la formación de quiasmas, o en la proporción de espermátidas anómalas (Sarasa *et al.*, 2013).

Este mecanismo de incompatibilidad citoplasmática (uni o bidireccional) provocaría una barrera al flujo genético entre poblaciones con distinto estatus de infección. Una barrera que será asimétrica en el caso de la IC unidireccional (Telschow *et al.*, 2002a; 2005a; Telschow *et al.*, 2005b; Flor *et al.*, 2007; Telschow *et al.*, 2007).

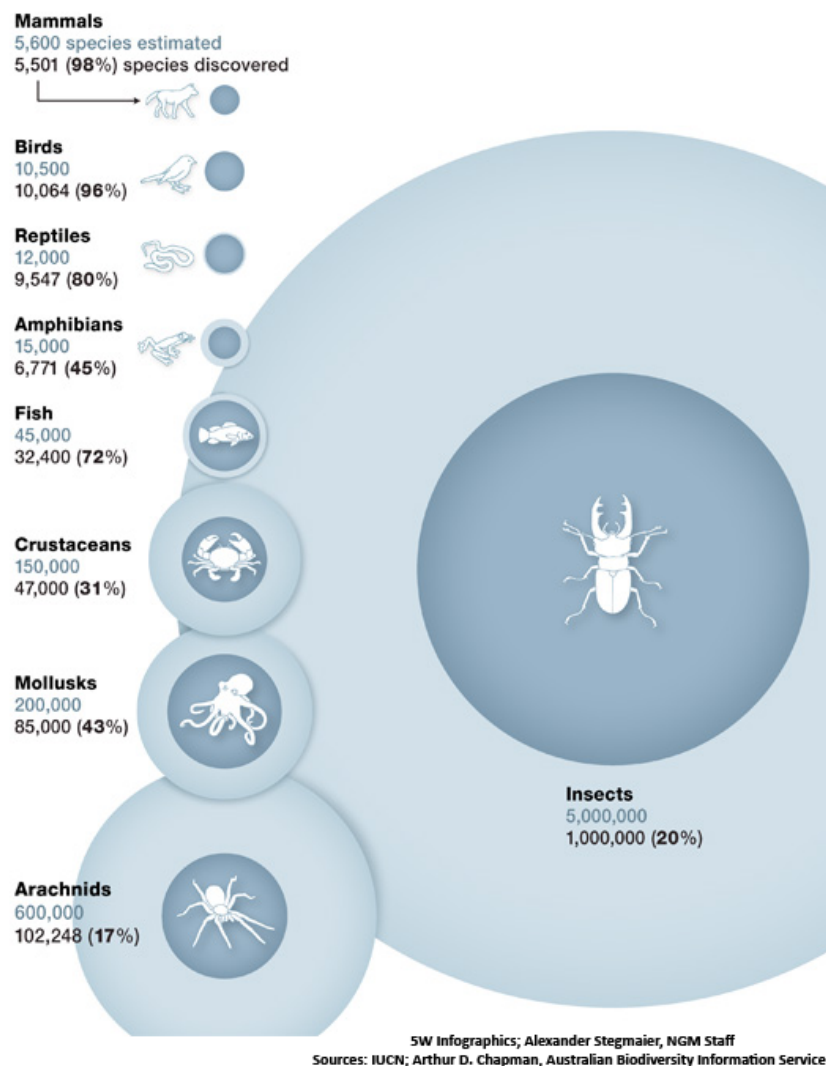


Fig. 6: Estimación de número de especies descritas (y estimadas) para distintas clases. Tomado de *National Geographic* (<http://ngm.nationalgeographic.com/2013/04/explore/seeking-new-species>).

El caso mejor conocido en relación al posible papel de *Wolbachia* en la formación de nuevas especies lo constituyen los estudios sobre *Nasonia sp.* (Himenóptera). Existen evidencias de que el aislamiento reproductivo mediado por *Wolbachia* es anterior a otros mecanismos que puedan estar causando aislamiento reproductivo entre *N. giraulti*, *N. longicornis* y *N. vitripennis*. Estos estudios apoyarían la idea de que *Wolbachia* pueda jugar un papel importante en los procesos de aislamiento reproductivo y especiación (Bordenstein & Werren, 1998; 2000; 2007; Bordenstein *et al.*, 2003; Brucker & Bordenstein, 2012b). Sin embargo, el efecto de la incompatibilidad citoplasmática en la evolución de los hospedadores no se limita a su papel como barrera reproductiva, sino que además podría inducir la selección de caracteres

prezigóticos (Telschow *et al.*, 2005a; Telschow *et al.*, 2005b), estando implicada en *reinforcement* (Jaenike *et al.*, 2006). Teóricamente, las hembras infectadas por una cepa que fueran capaces de reconocer a un macho infectado por una cepa compatible, se verían favorecidas. Lo mismo ocurriría en el caso de IC unidireccional. En este caso las hembras no infectadas capaces de evitar las cópulas con machos infectados, se verían favorecidas. Existen evidencias contrapuestas a este respecto en *Drosophila*.

### 5.3 Transmisión de *Wolbachia*.

*Wolbachia* se transmite principalmente vía materna, esto es, se transmite a la descendencia a través de los ovocitos de hembras infectadas. Las tasas de transmisión detectadas en experimentos de laboratorio son generalmente muy altas, en torno al 99-100% (Serbus *et al.*, 2008). Por contra, la transmisión paterna se considera despreciable, estimándose que puede existir un 2% de descendientes infectados por esta causa (Turelli & Hoffmann, 1995).

Las tasas de transmisión materna en la naturaleza pueden verse afectadas por varios condicionantes que limitarían su eficiencia (Turelli & Hoffmann, 1995; Marcade *et al.*, 1999; Narita *et al.*, 2007). En primer lugar, debemos tener en cuenta que en condiciones naturales la densidad bacteriana suele ser menor que en condiciones de laboratorio, lo que es muy relevante dado que la densidad bacteriana se correlaciona positivamente con la eficiencia en la transmisión de la infección y el nivel de incompatibilidad citoplasmática (McGraw *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003a; Duron *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2006; Duron *et al.*, 2007; Mouton *et al.*, 2007). Múltiples factores bióticos y abióticos pueden condicionar la densidad de *Wolbachia*, por ejemplo variables ambientales como las altas temperaturas (Clancy & Hoffmann, 1998; Hurst *et al.*, 2001), el tiempo de la diapausa (Perrot-Minnot *et al.*, 1996), la presencia de antibióticos naturales en la dieta (Stevens *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2010), o la edad de los machos (Reynolds & Hoffmann, 2002; Reynolds *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2007; Tortosa *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010). También la activación diferencial del sistema inmune parece estar relacionada con los niveles de infección. De hecho existe una interacción íntima entre esta bacteria y el sistema inmune del hospedador (Braquart-Varnier *et al.*, 2008; Siozios *et al.*, 2008; Kambris *et al.*, 2010; Chevalier *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011).

Los mecanismos por los cuales *Wolbachia* se transfiere desde una hembra infectada a sus ovocitos no se conocen en detalle. Se ha descrito un patrón de migración de la bacteria a lo largo de la ovogénesis dependiente de microtúbulos, y parece ser que las bacterias utilizarían las

proteínas de transporte celular dependientes de éstos (Kinesinas y Dineínas) para desplazarse (Serbus *et al.*, 2008).

Por otro lado, la discordancia entre la filogenia de *Wolbachia* y sus hospedadores ha hecho plantear la posibilidad de tasas significativas de transmisión horizontal, esto es, entre distintos taxones (Vavre *et al.*, 1999; Noda *et al.*, 2001b; Hughes *et al.*, 2004; Haine *et al.*, 2005; Russell & Moran, 2005; Sintupachee *et al.*, 2006; Raychoudhury *et al.*, 2009; Ferrari & Vavre, 2011; Kraaijeveld *et al.*, 2011; Kremer & Huigens, 2011; Zug *et al.*, 2012). Este punto es de especial interés en *C. parallelus*, debido a la presencia de parasitoides infestando las poblaciones naturales de este ortóptero. Esta cuestión será planteada con más detalle en el apartado “Transmisión horizontal”, pág. 48.

## 5.4 Modelos matemáticos.

Se han desarrollado numerosos modelos matemáticos para explicar la dinámica de la infección por *Wolbachia*. Originariamente se desarrollaron modelos sencillos, que consideraban generaciones discretas y definían tres parámetros principales para explicar la expansión de la infección en la población: la fecundidad (F), la eficiencia de la transmisión ( $1 - \mu$ ), y el nivel de la incompatibilidad ( $1 - H$ ) (Turelli, 1994):

- (i) La fecundidad tenía en cuenta la fecundidad relativa de las hembras infectadas por *Wolbachia* respecto a las hembras no infectadas. Para estimar este parámetro se proponía utilizar índices como por ejemplo el número de huevos (Weeks *et al.*, 2007), el número de descendientes adultos (Bordenstein & Werren, 2000), o en el caso de *Chorthippus parallelus*, donde la obtención de descendencia adulta en laboratorio puede ser complicada, se ha propuesto emplear el número de huevos multiplicado por la proporción de embriones en un determinado tipo de cruzamiento (Zabal-Aguirre, com. pers.). El parámetro ( $1-F$ ) nos indicaría el “coste de la infección”.
- (ii) La tasa de transmisión se definía como ( $1-\mu$ ), pudiéndose estimar como el porcentaje de embriones infectados procedentes de un cruzamiento en el que la hembra estaba infectada, donde “ $\mu$ ” será el porcentaje de huevos no infectados (Rasgon & Scott, 2003).
- (iii) El nivel de incompatibilidad se puede estimar mediante la tasa de eclosión (Rasgon & Scott, 2003; Zabal-Aguirre, com. pers.) en los cruzamientos incompatibles en relación a dicha tasa estimada en los cruzamientos compatibles. De este modo puede establecerse el nivel de incompatibilidad en los cruzamientos susceptibles de sufrir incompatibilidad



unidireccional ( $H_{UNI}$ ), así como en aquellos susceptibles de sufrir incompatibilidad bidireccional ( $H_{BI}$ ). El nivel de IC, puede estimarse respectivamente como  $1 - H_{UNI}$  y  $1 - H_{BI}$ .

La conclusión principal de estos primeros modelos fue detectar que existía un umbral mínimo en las frecuencias de infección para que ésta prosperara en la población. Dicho umbral dependía de los parámetros anteriores, pero también de la ploidía del hospedador. Esto es, el parámetro “p” cambia su valor para especies diploides, haplodiploides, o haploides (Vautrin *et al.*, 2007). A su vez, estos parámetros modulan las fluctuaciones en las frecuencias de infección por *Wolbachia* a lo largo de generaciones sucesivas.

Por otra parte, el modelo primigenio propuesto por Turelli (1994), defiende que existe selección dependiente de frecuencia a favor de las hembras infectadas, dado que estas hembras podrían cruzarse potencialmente con cualquier macho de la población, independientemente de su infección. Esta selección es dependiente de frecuencia dado que en condiciones en las que existan frecuencias de infección bajas, esta ventaja adaptativa no sería tal. Sin embargo, traspasado un límite estas hembras presentarían una ventaja clara sobre las hembras no infectadas, que podrían verse afectadas por la incompatibilidad.

Posteriormente se desarrollaron modelos complejos que tenían en cuenta la existencia de varias cepas bacterianas (Frank, 1998), así como la estructura de las poblaciones infectadas y la migración entre ellas, con el fin de estimar si *Wolbachia* puede ser una barrera eficaz al flujo génico (Telschow *et al.*, 2002b; a; Engelstädter *et al.*, 2004; Telschow *et al.*, 2005a; Telschow *et al.*, 2005b; Telschow *et al.*, 2006; Flor *et al.*, 2007; Telschow *et al.*, 2007; Engelstaedter & Telschow, 2009). Por su parte, Hilgenboecker *et al* (2009) y Brucker & Bordenstein (2012a) exploran la integración de la incompatibilidad citoplasmática causada por *Wolbachia* en el modelo de DM, con el fin de valorar cómo puede influir en el flujo génico entre poblaciones la interacción de ambos tipos de incompatibilidades nucleares y citoplasmáticas. Vautrin *et al.*, (2007; 2008) re-escribieron el modelo propuesto por Turelli (1994) en forma matricial. Esta nomenclatura hacía muy accesible la modelización y permite estudiar la dinámica del remplazo de unas cepas por otras, considerando la coinfección.

Sin embargo, estos modelos no consideraban aspectos específicos de la biología de los hospedadores, o su ambiente, factores que pueden afectar a las frecuencias de infección en la naturaleza (Breeuwer & Werren, 1993; Giordano *et al.*, 1995b; McGraw *et al.*, 2002a). La selección divergente puede favorecer formas de adaptación local (Keller & Seehausen, 2012), y en este sentido, consideramos que la temperatura, y otros condicionantes ambientales, pueden ser relevantes para entender la dinámica de la infección. *Wolbachia* se considera una bacteria



termosensible, y de hecho en varios estudios se han empleado choques térmicos para eliminar la infección. Además se ha comprobado el efecto que la temperatura tiene sobre la densidad bacteriana (Clancy & Hoffmann, 1998; Van Opijnen & Breeuwer, 1999; Hurst *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2003; Mouton *et al.*, 2006; Anbutsu *et al.*, 2008; Jeyaprakash & Hoy, 2010; Bordenstein & Bordenstein, 2011; Guruprasad *et al.*, 2011b).

Por otro lado, los modelos actuales tampoco consideran la posibilidad de que la infección disminuya con la edad del hospedador, como se ha demostrado en algunos organismos (Reynolds & Hoffmann, 2002; Reynolds *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2007; Tortosa *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Brelsfoard & Dobson, 2011).

En nuestro caso, y como veremos más adelante, tras el estudio de las variaciones en la frecuencia de infección a lo largo de la vida del hospedador, se ha planteado la necesidad de implementar este efecto en los modelos previamente descritos. Para ello, se ha introducido esta nueva variable en el modelo matricial propuesto por Vautrin *et al.* (2007). De este modo, independientemente del factor que provoque la variación intra-anual de la infección (temperatura, factores genéticos, edad de los machos, otros...), podremos modelizar el efecto a largo plazo que dicha variación puede tener en las poblaciones naturales.

## **6 INFECCIÓN POR *WOLBACHIA* EN *C. PARALLELUS*.**

Recientemente, se ha detectado la infección por la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en *C. parallelus* (Dillon *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b; Sarasa *et al.*, 2013). El análisis filogenético del gen 16S *rRNA* de *Wolbachia* muestra la existencia de al menos dos supergrupos distintos de esta bacteria infectando a este ortóptero (Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). *C. parallelus* está infectado por cepas pertenecientes a los supergrupos B y F de *Wolbachia*. A su vez, existen individuos coinfectados por ambos supergrupos.

Los efectos que *Wolbachia* puede inducir en *C. parallelus*, han sido estudiados mediante cruzamientos experimentales realizados entre individuos infectados y no infectados, y entre individuos infectados por los distintos supergrupos bacterianos detectados. Estos estudios muestran que *Wolbachia* induce IC unidireccional y bidireccional en distinto grado, con las consiguientes consecuencias en la dinámica de la zona híbrida (Zabal-Aguirre, com. pers; Bella *et al.*, 2010). Así, en los cruzamientos entre individuos híbridos susceptibles de sufrir IC se observó una reducción en el número de embriones obtenidos. También se observó esta reducción,



aunque menor, en los cruzamientos susceptibles de sufrir IC bidireccional. Los datos actuales sugieren valores de  $H_{UNI}=0.67$  y  $H_{BI}=0.83$  (Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010).

Esclarecer las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas detectadas de *Wolbachia*, es esencial para conocer la implicación de esta bacteria en la dinámica de la zona híbrida, así como el origen de la infección. Gran parte de los estudios filogenéticos llevados a cabo, se han basado hasta hace pocos años en los genes *16S rRNA*, *ftsZ* (división celular) y *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) con las limitaciones derivadas de la utilización en cada caso de un solo *locus*. Los proyectos de secuenciación de los genomas de las cepas *wMel* (supergrupo A) que infecta a *Drosophila melanogaster* y de la cepa *wBm* (supergrupo D), que infecta al nematodo *Brugia malayi* (Wu *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2005) han permitido desarrollar nuevos sistemas de detección y clasificación de *Wolbachia* (ver pág. 32).

## **7 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE WOLBACHIA.**

La selección de las secuencias moleculares para analizar la diversidad del género *Wolbachia* debe basarse en criterios objetivos, teniendo en cuenta la pregunta que se quiere responder en cada estudio concreto. En el caso preciso de la evolución microbiana, tradicionalmente han sido empleadas secuencias de los genes ribosomales, como la del gen *16S rRNA*.

Se ha seleccionado este gen debido a las múltiples ventajas que supone la obtención de secuencias mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un gen muy conservado, tanto en cepas susceptibles de cultivo como en muestras ambientales. A su vez, el gen *16S rRNA* permite realizar estudios tanto de evolución reciente entre clados cercanos, como realizar reconstrucciones filogenéticas que incluyan tanto a Eubacterias como a Archaeas. Esta posibilidad recae en las distintas tasas evolutivas que presentan distintas regiones de esta molécula (Ludwig & Schleifer, 1994; Gao & Gupta, 2005). Sin embargo, la elección de este gen puede también presentar desventajas en función del estudio que quiera realizarse. Por ejemplo, es susceptible de mostrar procesos de convergencia basados en el incremento del contenido de C+G en especies termófilas. Estas especies, que no tienen un antecesor común, pueden aparecer agrupadas debido a un fenómeno conocido como “*long branch attraction*” o “*efecto de atracción por ramas largas*”. Este artefacto en la inferencia filogenética se observa cuando, como consecuencia de diferencias importantes en las tasas evolutivas entre distintas ramas, se tienden a agregar secuencias que realmente no comparten un antecesor común (Bergsten, 2005; Philippe *et al.*, 2005).





Por otra parte, la elección del gen *16S rRNA*, presenta limitaciones cuando el objeto de estudio son procesos evolutivos muy recientes, esto es, estudios que tienen por objeto las relaciones evolutivas entre géneros, e incluso dentro de la misma especie. Para este tipo de análisis la elección de las secuencias puede centrarse en genes con tasas evolutivas más rápidas. Una opción pueden ser las secuencias codificantes, dado que incluso en el caso de proteínas conservadas, las secuencias de ADN son susceptibles de presentar mayor variabilidad que los genes ribosomales, extremadamente conservados. En estudios filogeográficos, se pueden incluso incorporar al análisis pseudogenes (Holt *et al.*, 2009) o regiones intergénicas (Grundmann *et al.*, 2000), muy variables. Sin embargo, debemos considerar las dificultades técnicas que pueden presentar estos genes a la hora de alinear estas secuencias y los posibles errores en las inferencias realizadas a partir de alineamientos erróneos (Templeton *et al.*, 1995; Carstens *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2008). A su vez, se debe tener presente la posible existencia de fenómenos de recombinación, así como de elementos móviles que pueden distorsionar las relaciones evolutivas entre “Unidades Taxonómicas Operativas” (OTUs) (Barton *et al.*, 2007). Así pues, se deben evitar secuencias con una mayor tendencia a la transferencia lateral de genes, o cuya historia filogenética no sea paralela a la historia evolutiva de las especies estudiadas (Baldo *et al.*, 2002; Baldo *et al.*, 2005; Baldo & Werren, 2007).

Recientemente, y con el fin de diseñar un sistema estandarizado, Baldo *et al.* (2006b) propusieron un “*Sistema de Clasificación Multilocus*” (MLST) diseñado específicamente para *Wolbachia*. Esta aproximación se utilizó inicialmente en estudios epidemiológicos para la clasificación de especies bacterianas en enfermedades humanas (Maiden *et al.*, 1998). También se ha contemplado su utilidad en análisis poblacionales y evolutivos, como por ejemplo, en la estima de las tasas de mutación y recombinación entre cepas, en el estudio de las relaciones evolutivas entre dichas cepas, así como en distintos estudios filogeográficos de otras bacterias (Falush *et al.*, 2003a; Falush *et al.*, 2003b; Fearnhead *et al.*, 2005).

El MLST se ha implementado en gran parte de los estudios filogenéticos del género *Wolbachia*, adquiriendo una gran difusión entre la comunidad científica. A su vez, las bases de datos disponibles hacen que la información disponible sobre el género y su diversidad aumente exponencialmente (Baldo *et al.*, 2006b). En nuestro caso, el MLST se plantea como una herramienta muy útil para llegar a analizar en profundidad la diversidad bacteriana dentro de este género, siendo éste uno de los objetivos principales planteados en este trabajo, al menos en cuanto a su relación con la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* (ver más adelante).

## 7.1 Sistemas de Clasificación Multilocus: una aproximación a la identificación de clones bacterianos.

La necesidad de optimizar una metodología capaz de identificar adecuadamente distintas cepas bacterianas y comparar la información entre laboratorios, hacen de los métodos de tipificación molecular una herramienta esencial, tanto a nivel epidemiológico como a nivel evolutivo (van Belkum *et al.*, 2001). La metodología clásica de detección y clasificación bacteriana presenta varias deficiencias, entre las cuales podemos destacar su incapacidad para discriminar entre cepas filogenéticamente cercanas, la escasa reproducibilidad, y la imposibilidad de cuantificar la distancia genética entre clones (Achtman, 1998).

Desde el punto de vista microbiológico, las metodologías moleculares permiten, en primer lugar, el estudio a nivel local de la diversidad microbiana y de las relaciones filogenéticas de las cepas bacterianas aisladas, y en segundo lugar, realizar estudios filogeográficos, de gran interés a nivel epidemiológico. Independientemente de la metodología más apropiada para cada tipo de estudio, la característica esencial de los sistemas de tipificación molecular, será su alta capacidad de discriminación, así como su reproducibilidad entre laboratorios (Maiden *et al.*, 1998).

El “*Multilocus Sequence Typing*”, MLST, como se ha indicado anteriormente fue desarrollado en 1998 por Maiden *et al.* (1998), en base a técnicas moleculares previas como la MLEE (“*Multilocus Enzyme Electrophoresis*”) o PFGE (“*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”), utilizando varios *loci* para describir la diversidad bacteriana. Para ello, los autores identifican alelos a partir de las secuencias nucleotídicas de fragmentos internos de genes conservados (principalmente genes *housekeeping*) en lugar de describirlos en base a la movilidad electroforética de la enzima que codifican. Esta modificación, además de evidenciar una mayor diversidad alélica, permite el intercambio entre laboratorios de información reproducible a través de bases de datos específicas (Maiden *et al.*, 1998).

## 7.2 Diseño de Sistemas de Clasificación Multilocus (MLST).

El diseño de un MLST presenta tres puntos críticos. En primer lugar la elección de las cepas bacterianas que se utilizarán para la evaluación inicial del sistema de clasificación, en segundo lugar la elección de los *loci* a analizar y en tercer lugar, el diseño de *primers* específicos (Urwin & Maiden, 2003).

El primero de estos puntos críticos puede ser más o menos complejo en función del organismo seleccionado para su examen, siendo más complicado en aquellos casos en los que el objeto de estudio sean microorganismos procedentes de muestras ambientales, endosimbiontes o cualquier organismo cuyo cultivo en laboratorio suponga un problema metodológico. Respecto a la elección de los *loci*, se seleccionarán aquellos conservados (principalmente genes *housekeeping*), flanqueados por genes similares (Maiden *et al.*, 1998). El número de nucleótidos secuenciados generalmente será de unos 450 pb, correspondientes a las lecturas procedentes de una única reacción de secuenciación en cada sentido. Finalmente, los distintos “proyectos genoma” facilitan la elección de genes candidatos y el diseño de *primers* adecuados mediante los distintos paquetes informáticos existentes (Urwin & Maiden, 2003).

### 7.3 Caracterización de cepas.

La estrategia MLST permite caracterizar cepas bacterianas en función de su variabilidad genética (Popoff *et al.*, 1998). Para el análisis mediante MLST, a cada secuencia única de un *locus* concreto se le asigna un número de alelo en función del orden de su descubrimiento (de forma análoga al protocolo seguido en la MLEE). Los alelos presentes en cada uno de los *loci* analizados son combinados dando lugar a un archivo de alelos y asignados a un determinado ST (“Sequence Type”) (Maiden *et al.*, 1998). Por ejemplo, siguiendo la nomenclatura oficial, la cepa ST-71 de las bases de datos estará caracterizada por un archivo alélico de los 5 *loci* considerados [34, 32, 37, 29 y 34], pertenece al supergrupo A y se ha descrito en *Agelenopsis* sp. Esta designación es análoga al ET (“Electrophoresis Type”) asignado en la MLEE. La relación entre cepas se obtiene al comparar STs: cepas cercanas compartirán el mismo ST, o STs que difieran en pocos *loci*, mientras que las cepas no relacionadas presentarán STs diferentes (ver también Fig. 14).

Actualmente se han desarrollado sistemas de clasificación multilocus para numerosos organismos procariotas (Dingle *et al.*, 2001; Homan *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003). A su vez, la posibilidad de transferencia de los protocolos de amplificación, *primers* y secuencias hacen que esta metodología sea frecuente en la bibliografía (Urwin & Maiden, 2003).

### 7.4 Bases de datos de MLST.

Una de las cualidades de la clasificación molecular de cepas bacterianas es la posibilidad de incorporar en bases de datos específicas la información referente a las distintas cepas aisladas y caracterizadas. Así pues, el acceso a estos datos está disponible para el diagnóstico clínico, la



monitorización epidemiológica, y estudios poblaciones a través de las conocidas como *MLST websites* (<http://www.mlst.net>) (Jolley *et al.*, 2004). Estas bases de datos, frente a otras estándar, permiten acceder a esta información previamente revisada, evitando la aparición de alelos inexistentes como consecuencia de errores de secuenciación (Enright & Spratt, 1999). Existen distintos paquetes informáticos diseñados para el análisis de datos MLST (Chan *et al.*, 2001a; Jolley *et al.*, 2001; Didelot & Falush, 2007).

## **7.5 Análisis e interpretación de los datos MLST.**

El concepto de complejo clonal, introducido para describir en primera instancia a poblaciones de *Neisseria meningitidis* en sistemas MLEE, ha sido trasladado al análisis de datos MLST (Caugant *et al.*, 1987). Un complejo clonal incluye bacterias genéticamente relacionadas, pero no idénticas, que comparten un número mínimo de alelos para los distintos *loci* analizados. Generalmente, la asignación de cepas bacterianas a complejos clonales permite clasificar cepas bacterianas de forma robusta (Dingle *et al.*, 2001; Feil *et al.*, 2001).

Un análisis de la frecuencia de los distintos STs descritos para una bacteria, revelará la prevalencia de determinados STs frente a otros, poco frecuentes. El análisis por métodos heurísticos de esta información, mediante por ejemplo el paquete informático START2 (Jolley *et al.*, 2001), permite asignar a estos STs frecuentes una posición central, a partir de la cual pueden explicarse STs derivados a partir de números limitado de eventos genéticos. Estos STs centrales, constituyen la base del complejo clonal. El haplotipo central del complejo clonal le dará un nombre, que en función de la especie bacteriana, se caracterizará por compartir un número mínimo de alelos idénticos (Dingle *et al.*, 2001).

## **7.6 Aplicaciones y limitaciones del sistema MLST.**

Los sistemas de clasificación molecular como el MLST han sido aplicados en estudios epidemiológicos (Aires de Sousa *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Además, este sistema ha sido introducido en análisis poblacionales con el fin de estimar tasas de mutación y recombinación, así como las relaciones evolutivas entre bacterias dentro del mismo género (Feil *et al.*, 2001; Jolley *et al.*, 2004). Incluso, en casos concretos, como es el estudio de la bacteria *Helicobacter pylori*, la clasificación molecular de las distintas cepas permite establecer patrones biogeográficos, que han sido propuestos como una herramienta eficaz en el análisis de las migraciones humanas (Falush *et al.*, 2003a; Falush *et al.*, 2003b).

La principal limitación de la metodología recae en la variabilidad de los genes *housekeeping* caracterizados en el análisis. En casos donde las cepas bacterianas sean muy próximas, el análisis deberá complementarse con genes cuyas tasas evolutivas sean mayores (Kidgell *et al.*, 2002).

## **7.7 Sistema de Clasificación Multilocus para *Wolbachia*.**

La primera cepa descrita para este género fue caracterizada en el mosquito *Culex pipiens* en el laboratorio del Dr. B. Wolbach, denominándose posteriormente *Wolbachia pipientis* (Hertig & Wolbach, 1924). Actualmente han sido identificadas múltiples cepas, adscritas a los 8 supergrupos aceptados actualmente, y que han sido descritos en base a los genes *16S rRNA*, *ftsZ* y *Wsp* (*Wolbachia surface protein*). Sin embargo la gran diversidad incluso dentro de los grupos hace que existan varias propuestas de nuevos supergrupos (Ros *et al.*, 2009).

El MLST para esta bacteria tiene por objetivo facilitar un protocolo estándar de clasificación que permita caracterizar las distintas cepas identificadas en este género. Por otro lado, esta aproximación permite cuantificar la diversidad bacteriana existente, evitando algunos de los inconvenientes de la metodología tradicional. La utilización del gen *wsp*, muy extendida en la bibliografía, debe ser considerada con precaución, debido a sus altas tasas de recombinación (Werren & Bartos, 2001; Baldo *et al.*, 2005) y la fuerte selección disruptiva detectadas para este gen (Baldo *et al.*, 2002; Jiggins, 2002). A su vez, la detección de recombinantes inter- e intra-génicos en distintas cepas de *Wolbachia* (Werren & Bartos, 2001; Baldo *et al.*, 2005), sugiere la necesidad de analizar varios *loci*. Previamente, esta aproximación multilocus había sido propuesta por Paraskevopoulos *et al.*, (2006) para la clasificación de las distintas cepas bacterianas que infectan a *Drosophila sp.* con buenos resultados en cuanto a su capacidad de discriminación entre cepas. El sistema propuesto por Baldo *et al.*, (2006b) ha sido diseñado para la caracterización de cepas que infectan a multitud de hospedadores, y a su vez se incluye en las bases de datos previamente diseñadas (Jolley *et al.*, 2004) y que recogen la información de las nuevas cepas descritas (<http://pubmlst.org>).

### **7.7.1 Información disponible en las bases de datos.**

La base de datos creada para albergar la información asociada al MLST para el género *Wolbachia sp.* dispone de tres bloques de datos esenciales:

- (i) Una recopilación de los perfiles alélicos, que alberga las secuencias de los distintos alelos caracterizados para cada *locus*, los perfiles alélicos de cada cepa, constituidos por los 5 *loci* (ver siguiente apartado), y el ST asignado a cada perfil.
- (ii) Una base de datos de cepas aisladas, que recoge la información biológica sobre estas cepas, su hospedador, localización geográfica, laboratorio, etc.
- (iii) Un recopilatorio para centralizar la información del sistema de clasificación basado en el gen *wsp* (Jolley *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2006b).

### 7.7.2 *Loci* seleccionados en el análisis de cepas de *Wolbachia*.

Los *loci* de este MLST han sido elegidos en base a los criterios establecidos en los sistemas MLST estándar:

- (i) Presencia a lo largo del clado Rickettsiales.
- (ii) Genes de copia única en el genoma de *Wolbachia* WMel (Wu *et al.*, 2004).
- (iii) Distribución amplia en el genoma de *Wolbachia* WMel (Wu *et al.*, 2004).
- (iv) Evidencia de selección estabilizadora en el género *Wolbachia* con  $Ka/Ks \ll 1$ .  $Ka/Ks$  es el cociente entre la tasa de sustitución no sinónima ( $Ka$ ) y la tasa de sustitución sinónima ( $Ks$ ). Este cociente se emplea como un indicador de presión selectiva en genes codificantes de proteínas. Valores mayores que 1, son generalmente indicativos de selección positiva. Por contra, valores inferiores a 1, se interpretan como selección estabilizadora (Maiden *et al.*, 1998; Urwin & Maiden, 2003).

Los genes seleccionados con estos criterios son:

- (i) *gatB*, que codifica para la unidad B de la aspartil/glutamil-tRNA amidotransferasa.
- (ii) *coxA* que codifica para la subunidad catalítica de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria.
- (iii) *hcpA*, que codifica para una proteína hipotética no caracterizada.
- (iv) *ftsZ*, que codifica para una proteína implicada en la división celular.
- (v) *fbpA*, que codifica para la fructosa-bifosfato aldolasa, implicada en la gluconeogénesis.

Los *primers* descritos en la bibliografía han sido diseñados para amplificar ADN de cepas pertenecientes a los supergrupos A y B, así como potencialmente aquellas especies pertenecientes a otros supergrupos (Baldo *et al.*, 2006b).

Originariamente, el sistema de MLST fue desarrollado utilizando como unidad de análisis el número alélico, sistema apropiado para organismos entre los cuales el intercambio horizontal de genes es común. Sin embargo, los datos pueden ser interpretados desde el punto de vista filogenético, considerándose la sustitución nucleotídica como unidad de estudio. Esta perspectiva puede ser más informativa en cepas bacterianas próximas.

Como ya se ha dicho anteriormente, la utilización del gen *wsp*, extendida en la bibliografía, debe ser considerada con precaución, debido a las altas tasas de recombinación (Werren & Bartos, 2001; Baldo *et al.*, 2005) y la fuerte selección disruptiva detectadas para este gen (Baldo *et al.*, 2002; Jiggins, 2002). El análisis del gen *wsp* permite realizar un análisis filogenético complementario al MLST, pero no sustitutivo. Sin embargo al basarse esta clasificación de cepas en la secuencias aminoacídica de las 4 regiones hipervariables del gen, nos permite observar diferencias entre cepas más próximas (Baldo *et al.*, 2005; Baldo & Werren, 2007).

## **8 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA.**

Un árbol filogenético es la representación gráfica de las relaciones evolutivas entre Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) que comparten un antecesor común. Cuando hablamos de OTUs, podemos referirnos tanto a especies, como de forma más específica a genes, genomas, etc., (Ronquist, 2012).

Teniendo en cuenta que raramente podemos observar de forma directa el proceso evolutivo, la reconstrucción filogenética tendrá por objetivo el representar este proceso a partir de información indirecta. De este modo, un árbol filogenético, con su patrón específico de ramas y la longitud de éstas, representará a los descendientes de un antecesor común en sus diferentes líneas como un clado. Se considerarán como clados únicamente aquellos grupos que sean monofiléticos, es decir, aquellos grupos en los que estén incluidos todos los organismos que han evolucionado a partir de un antecesor común y ningún otro (Nei & Kumar, 2000; Ridley, 2004; Barton *et al.*, 2007; Lemey *et al.*, 2009).

El concepto biológico, la idea de un antecesor común que pueda ser relacionado con sus descendientes actuales en forma de árbol, no es nueva. Ya Darwin, en la única imagen que incluye el Origen de las Especies (Darwin, 1859), propone esta representación. Sin embargo, la



utilización de métodos cuantitativos (Sneath & Sokal, 1973) y su aplicación a datos moleculares (Zuckerlandl & Pauling, 1965) es relativamente reciente. En la era genómica, en la que la secuenciación de ADN se ha convertido en una tecnología rápida y accesible y las bases de datos permiten el acceso público a gran cantidad de información, la filogenia molecular es una herramienta indispensable en estudios de distinta índole, cuyo objetivo común es el estudio de la historia evolutiva (Baldauf, 2003).

La inferencia filogenética se basa en el análisis de las similitudes y diferencias entre las entidades biológicas que se elijan para la reconstrucción de la historia evolutiva de un grupo de organismos. Debido a su complejidad, el análisis de las diferencias entre las OTUs seleccionadas que constituyen el fin del proceso evolutivo no nos permitirá inferir de forma directa su historia evolutiva. La inferencia filogenética debe emplear distintas metodologías que tengan en cuenta esta complejidad, así como métodos objetivos de evaluación de los resultados obtenidos (Barton *et al.*, 2007).

### **8.1 Filogenia molecular.**

La elección de secuencias moleculares como carácter de estudio, frente a caracteres morfométricos, fue objeto de debate (Page & Holmes, 1998). La filogenia molecular presenta ciertas ventajas frente a otros caracteres, como pueden ser la posibilidad de estudiar las bases moleculares del proceso evolutivo, así como la posibilidad de contar con caracteres bien definidos en sus valores [esto es, únicamente 4 posibilidades en el caso de las secuencias de ADN (A, T, C, G) o 20 posibilidades (20 aminoácidos), si consideramos proteínas]. Esta ventaja se acentúa si comparamos con caracteres morfométricos, controlados generalmente por QTL ("Quantitative Trait Loci") y sometidos a las influencias ambientales (Page & Holmes, 1998; Barton *et al.*, 2007). A su vez, la secuenciación de ADN se ha convertido en una metodología fácil y "económica", lo que facilita enormemente el crecimiento de las bases de datos de secuencias de ADN. Que estas últimas sean abiertas, evita un trabajo recurrente e innecesario de secuenciación de genes ya estudiados previamente (Koonin & Galperin, 2003).

La metodología empleada en filogenia molecular debe garantizar la resolución de tres problemas inherentes a cualquier carácter:

- (i) Tasas de divergencia no uniformes. Esto es, la posibilidad de que una rama concreta acumule varias diferencias frente a la posibilidad de que otra no acumule ninguna.



- (ii) Evolución no vertical, mediada por ejemplo por procesos de recombinación (relativamente frecuentes en bacterias) o fenómenos de hibridación entre “especies”. Este hecho tiene una especial relevancia cuando estudiando determinadas OTUs, como puede ser por ejemplo un gen, intentamos inferir las relaciones evolutivas entre taxones, dado que la evolución de los genes no necesariamente debe ser la evolución de las especies (Page & Holmes, 1998).
- (iii) La existencia de homoplasia (es decir, presencia de rasgos compartidos con distinta procedencia evolutiva), debido a procesos de evolución paralela o convergencia (Barton *et al.*, 2007).

Si se garantiza la idoneidad de las secuencias seleccionadas para el estudio a realizar, la utilización de caracteres moleculares es muy potente a la hora de reconstruir la historia evolutiva de los seres vivos.

## 8.2 Alineamiento múltiple: punto crítico en el análisis filogenético.

El alineamiento múltiple, independientemente del algoritmo empleado, permite integrar las secuencias nucleotídicas analizadas en una matriz de datos, en la cual a cada secuencia se le asigna una fila, y a cada posición nucleotídica una columna. El objetivo del algoritmo es que en cada columna se encuentren alineadas las posiciones homólogas de cada secuencia. En otras palabras, estamos considerando que los residuos nucleotídicos en una columna concreta derivan por mutación del residuo presente en esa posición en un ancestro común. Hablamos pues de homología posicional (Thompson *et al.*, 1999).

Sin embargo, la sustitución nucleotídica no es trivial, y afecta directamente al resultado de las inferencias realizadas *a posteriori* (Morrison & Ellis, 1997). Esto es, los cambios que se producen en las secuencias no se corresponden sólo con la sustitución de un nucleótido por otro, si no que también son el producto de inserciones o deleciones. Esto implica que por ejemplo, la posición homóloga a la posición 10 de una secuencia cualquiera, se encuentre en la posición 13 de su secuencia homóloga, bien por una delección, bien por una inserción de tres pares de bases en alguna de las dos secuencias. Esto implica que durante el proceso de alineamiento deban no sólo buscarse las posiciones homólogas, si no que también, deban incorporarse por ejemplo “huecos” (*gaps*) para permitir un correcto alineamiento. Además de la complejidad que implica este hecho, eventos tales como traslocaciones o inversiones pueden complicar aun más la obtención de un alineamiento correcto. De ahí, la necesidad de emplear

distintos algoritmos (incorporados en diferentes paquetes informáticos) en función del conocimiento previo de las secuencias que se deseen analizar (ver Thompson *et al.*, 1994 para una revisión de varios de estos algoritmos; Thompson *et al.*, 1999).

Una aproximación relativamente extendida, consistiría en emplear la propia información que contienen las secuencias seleccionadas para su alineamiento. Esta progresiva aproximación a la solución óptima, inicia la búsqueda alineando dos secuencias al azar (insertando los “huecos” o *gaps* que sean necesarios para optimizar el alineamiento), tras lo cual este alineamiento queda bloqueado. A continuación una nueva secuencia se ordena/ajusta con el alineamiento previamente realizado, y así, sucesivamente, hasta que se obtiene el alineamiento de todas las secuencias. Debido a que el orden en el que se inicia el proceso puede ser relevante, distintos algoritmos emplean diferentes criterios sobre este inicio, estando generalizado el principio de “Máxima Similitud”. Esto es, el alineamiento se inicia con las dos secuencias que presentan una mayor similitud (alineamiento progresivo de secuencias) (Feng & Doolittle, 1987; Higgins & Sharp, 1988). Una regla básica de esta metodología será el mantenimiento de los “gaps” o “huecos” incorporados previamente (Higgins & Sharp, 1988), así como las distintas penalizaciones para la inclusión de nuevos huecos frente a la ampliación de los ya existentes (Hall, 2000).

En general, podemos clasificar las metodologías que optimizan este alineamiento en función de si éstas buscan optimizar el alineamiento a lo largo de toda la longitud de la secuencia (alineamiento global), o buscando regiones más cortas que presenten alta similitud (alineamiento local). Este último caso, es el que utiliza la herramienta *BLAST* (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul *et al.*, 1997). A su vez, una de las herramientas más empleadas, tanto por su versatilidad como por su condición de software gratuito, es el paquete *Clustal* (Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007).

Debemos considerar que el alineamiento de varias secuencias constituye en sí mismo una hipótesis de trabajo. Esto es, a partir de las similitudes en las distintas secuencias, estamos infiriendo qué posiciones son homólogas. Por tanto, debemos considerar, que si nuestra hipótesis de trabajo es errónea (por ejemplo, al considerar secuencias análogas como secuencias homólogas), la inferencia filogenética será igualmente errónea. Cuanto menor sea la distancia evolutiva entre las secuencias consideradas, los algoritmos de alineamiento múltiple nos ofrecerán hipótesis previsiblemente más cercanas a la “realidad”. Por otra parte, la elección de genes en los que intervenga por ejemplo la selección positiva, puede dificultar la obtención de un buen alineamiento. De igual modo, la aparición de múltiples deleciones o inserciones, dificultará la identificación de las posiciones homólogas entre genes (Barton *et al.*, 2007)

### 8.3 Selección del modelo evolutivo.

La evolución de las secuencias moleculares no es uniforme, por lo que serán necesarias determinadas aproximaciones para su modelización.

En primer lugar, debemos tener en cuenta la probabilidad de que puedan suceder varios cambios en una misma posición nucleotídica. La existencia de cambios múltiples implica la no linealidad entre la distancia evolutiva “real” y cualquier medida de la separación evolutiva entre secuencias, como puede ser el tiempo o el número de generaciones. Relacionado con las sustituciones múltiples está el problema de la saturación. Este artefacto se observa como consecuencia de que sólo puedan existir cuatro valores para cada posición nucleotídica (A, T, C o G) de modo que a partir de cierto momento, los nuevos cambios nucleotídicos sólo afectan a posiciones donde previamente ya se había producido una modificación, por lo que la señal filogenética de la secuencia se pierde (Gardiner, 1999; Nei & Kumar, 2000).

En segundo lugar, debemos considerar que no todos los cambios, esto es, el de un nucleótido por otro por mutación puntual, son igual de probables. Por ejemplo, en muchos genes la probabilidad de que se produzcan transiciones o transversiones no es la misma. En este caso pueden aplicarse distintas correcciones que establecen tasas de sustitución nucleotídica distintas para las transversiones frente a las transiciones (por ejemplo, *Kimura 2 parámetros*) (Kimura, 1980). Otros autores han modelizado distintas correcciones que tengan en cuenta la complejidad del proceso de sustitución nucleotídica: por ejemplo, el modelo *GTR (Generalised time-reversible)* (Tavaré, 1986) considera distintas tasas de sustitución nucleotídica para cada uno de los 6 posibles cambios nucleotídicos (Nei & Kumar, 2000).

Finalmente, debe considerarse la posibilidad de que a lo largo de la secuencia de ADN analizada la tasa de cambio evolutivo no sea constante, esto es, existan diferencias en la probabilidad de cambio para cada posición nucleotídica. Un ejemplo claro puede ser la tasa de sustitución nucleotídica en la posición 1, 2 o 3 de una secuencia codificante. En estos casos, la tasa de variación sigue aproximadamente una distribución gamma. Considerando esta distribución, distintos autores han diseñado correcciones que pueden complementar a las anteriormente mencionadas (Nei & Kumar, 2000; Lemey *et al.*, 2009).

Actualmente, existen distintos paquetes informáticos que permiten evaluar el modelo más adecuado, dado un alineamiento. El software *jModeltest* es uno de los más utilizados (Posada, 2008).

## 8.4 Inferencia filogenética.

Existen múltiples métodos de inferencia filogenética; sin embargo, a grandes rasgos, todos ellos pueden ser clasificados en cuatro grandes grupos: “Parsimonia”, “Distancia”, “Máxima Verosimilitud” e “Inferencia Bayesiana” (Page & Holmes, 1998; Nei & Kumar, 2000; Barton *et al.*, 2007; Lemey *et al.*, 2009). En este trabajo nos centraremos en comentar brevemente los dos últimos. Ambos ofrecen un marco estadístico para la reconstrucción filogenética e implementan un determinado modelo de sustitución nucleotídica, incorporando las distintas correcciones mencionadas (para una revisión ver Nei & Kumar, 2000; Barton *et al.*, 2007; Lemey *et al.*, 2009).

La determinación de la raíz del árbol filogenético permitirá considerar aquellos caracteres que son ancestrales, frente a los caracteres derivados. La inferencia de esta direccionalidad en el cambio evolutivo viene dada por la inclusión en el análisis de un grupo externo, un antecesor común de los taxones a analizar, cuyos caracteres se consideren ancestrales. La simplicidad sólo aparente de esta metodología, presenta un punto crítico, que es la elección, si existe, de este grupo externo (Nei & Kumar, 2000; Barton *et al.*, 2007; Lemey *et al.*, 2009).

Por otra parte, independientemente del método seleccionado, es importante tener un criterio que nos permita analizar cuán bueno es el árbol seleccionado. Es decir, hasta qué punto el árbol elegido representa los datos subyacentes: una aproximación a esta pregunta puede ser el método de remuestreo o *bootstrapping*. Esta metodología permite reconstruir series de datos mediante reordenación de los caracteres (posiciones homólogas) con remplazo. De este modo se pueden construir series de datos alternativas a partir de las cuales se elaboran los distintos árboles. Estos árboles serán comparados para determinar qué fracción del total de árboles construidos agrupan determinados OTUs (Nei & Kumar, 2000; Barton *et al.*, 2007; Lemey *et al.*, 2009). Sin embargo, se debe recalcar que esta metodología únicamente cuantifica la exactitud de un árbol en relación a los datos a partir de los cuales ha sido construido (Douady *et al.*, 2003; Alfaro & Holder, 2006). Si estos datos se desvían de la historia evolutiva “real”, por ejemplo por la inclusión de analogías, o un alineamiento erróneo, un árbol con altos valores de *bootstrap* será erróneo (Felsenstein, 1985; Hillis & Bull, 1993). En el caso de árboles construidos por Inferencia Bayesiana, la probabilidad posterior será una aproximación análoga, permitiéndonos valorar el árbol construido (Alfaro & Holder, 2006).

## 8.5 Máxima Verosimilitud (ML).

El concepto de *likelihood* o “verosimilitud” hace referencia a un proceso, habitual en las ciencias experimentales, en el que dados unos datos, el investigador debe decidir sobre una explicación adecuada a los mismos. En este caso, el modelo no se cuestiona (nuestro modelo es que las secuencias de ADN evolucionan según un determinado patrón). Pero sí cuestionamos nuestras hipótesis: ¿Qué árbol concreto explica nuestros datos, qué longitud de ramas, qué parámetros del modelo evolutivo considerado? Por tanto, lo que queremos computar es la probabilidad de obtener nuestros datos, dados los distintos valores para los parámetros de nuestro modelo evolutivo. Si variamos nuestras hipótesis (posibles árboles), el resultado será que algunas hipótesis permitirán recuperar nuestros datos experimentales con mayor probabilidad que otras.

El marco teórico en el que se basa esta metodología de máxima verosimilitud será la posibilidad de determinar la topología del árbol, la longitud de las ramas, y los distintos parámetros del modelo evolutivo (esto es, la ratio de transiciones/transversiones, las frecuencias de bases, la ratio de variación entre posiciones), que maximice la probabilidad de observar las secuencias de las que disponemos (Nei & Kumar, 2000; Lemey *et al.*, 2009).

Esto es, nuestra función de probabilidad será la probabilidad condicional de nuestros datos (nuestras secuencias) dada una hipótesis (esto es, el modelo de sustitución nucleotídica con un set de parámetros concretos y un árbol concreto, incluyendo su longitud de ramas), y los estimadores de máxima probabilidad serán aquellos que maximicen esa función de probabilidad. Para calcular la verosimilitud de cada árbol se deben combinar todos los estados de los nodos internos del árbol (Nei & Kumar, 2000; Lemey *et al.*, 2009). Este estimador puede obtenerse mediante algoritmos de optimización y búsquedas no exhaustivas como por ejemplo los implementados en software como *RaxML* (Stamatakis, 2006).

## 8.6 Inferencia Bayesiana (IB).

El concepto de probabilidad posterior es quizás menos intuitivo. Hablamos de la probabilidad posterior de un árbol como la probabilidad de que el árbol sea correcto, dados unos datos y un determinado modelo (Yang & Rannala, 2012). El mejor árbol será aquel con la mayor probabilidad posterior. La probabilidad posterior se obtiene por simulaciones de las Cadenas de Monte Carlo (MCMC). En estas simulaciones se parte de un árbol inicial que se

modifica parcialmente. Este árbol será aceptado con una probabilidad determinada, tras lo cual será el punto de partida para la siguiente modificación (Holder & Lewis, 2003).

Una ventaja de la “Inferencia Bayesiana” frente a otras metodologías es la posibilidad de cálculo de las probabilidades posteriores de cada clado del árbol (entendido como grupo monofilético de OTUs que comparten un antecesor común), una medida del soporte estadístico de dicho clado. Además, si bien su significado no es equivalente al “Bootstrapping” o remuestreo, su cálculo es mucho más rápido (Alfaro & Holder, 2006). Sin embargo debe tenerse en cuenta que las probabilidades posteriores pueden suponer una sobre-estimación de la probabilidad de un determinado clado (Yang & Rannala, 2005). Principalmente cuando se emplean modelos simples para la reconstrucción filogenética a partir de secuencias cuyo modelo de evolución es complejo (Suzuki *et al.*, 2002). Otra de sus ventajas, es la posibilidad de implementar fácilmente (debido al ahorro computacional que suponen estos algoritmos) la partición de archivos, asignando a cada partición un determinado modelo evolutivo (Yang & Rannala, 2012).

Sin embargo esta metodología presenta una limitación clara, y es la necesidad de especificar las distribuciones de los parámetros como “*priors*”. Esto es un problema cuando no se dispone de información *a priori*. Generalmente en estos casos se utilizan “*priors*” por defecto que suelen presentar una distribución plana, no informativa, lo cual se puede traducir en diferencias entre las topologías propuestas por esta metodología frente a la ML (Yang & Rannala, 2012).

## **9 COMUNIDAD BACTERIANA DE *C. PARALLELUS*: DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES.**

En los últimos 20 años hemos asistido a un interés creciente en el estudio de parásitos reproductivos, bacterias capaces de alterar la reproducción de sus hospedadores e incluso de condicionar su supervivencia (Moya & Peretó, 2011). Este interés nace en parte con el estudio de la bacteria *Wolbachia*, existiendo actualmente numerosos estudios al respecto. Sin embargo en los últimos 5 años, se han descrito distintos endosimbiontes, entre ellos *Cardinium*, que pueden causar incompatibilidad citoplasmática (Ros & Breeuwer, 2009; White *et al.*, 2009) o *Spiroplasma*, relacionada con alteraciones en la ratio de sexos de la descendencia de los insectos a los que infecta (Anbutsu & Fukatsu, 2003; Goto *et al.*, 2006; Anbutsu & Fukatsu, 2011). Estos endosimbiontes coinfectan a numerosas especies en las que *Wolbachia* había sido previamente descrita (Duron *et al.*, 2008) (ver Tabla 1).



Las comunidades bacterianas han sido analizadas al detalle en varios organismos, incluidos *Drosophila* spp. (Mateos *et al.*, 2006), mosquitos (Wang *et al.*, 2011), abejas (Moran *et al.*, 2012; Sabree *et al.*, 2012), *Nasonia* sp. (Brucker & Bordenstein, 2012b), y algunas especies de arañas (Goodacre *et al.*, 2006; Goodacre, 2011). Sin embargo la incidencia global de parásitos reproductivos posiblemente se esté infra-estimando, debido a que en la mayoría de los casos el número de individuos analizados es bajo, y las infecciones poco frecuentes o “raras”, podrían pasar desapercibidas. A esto se añade que la prevalencia de una determinada especie microbiana puede variar mucho de una población del hospedador a otra, hecho constatado por ejemplo en la infección por *Spiroplasma* de distintas poblaciones de *Drosophila* (Watts *et al.*, 2009). Debido a ello es necesario el desarrollo de estudios que analicen la diversidad bacteriana y las potenciales interacciones bacteria-hospedador en condiciones naturales (Weinert *et al.*, 2007).

<b>Bacterias que provocan alteraciones en la biología reproductiva de artrópodos</b>		
<b>Bacteria</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Hospedador (un ejemplo)</b>
<b><math>\alpha</math>-PROTEOBACTERIA</b>		
<i>Rickettsia</i> sp.	P MK	<i>Neochrysocharis formosa</i> (Hymenoptera: Eulophidae) <i>Brachys tessellatus</i> (Coleoptera: Buprestidae) <i>Adalia bipunctata</i> (Coleoptera: Coccinellidae) <i>Adalia decempunctata</i> (Coleoptera: Coccinellidae)
<i>Wolbachia pipientis</i>	CI F P MK Oogenesis	<i>Culex pipiens</i> (Diptera: Culicidae) <i>Armadillidium vulgare</i> (Isopoda: Armadillidiidae) <i>Trichogramma</i> spp (Hymenoptera: Pteromalidae) <i>Acraea encedon</i> (Lepidoptera: Nymphalidae) <i>Asobara tabida</i> (Hymenoptera: Braconidae)
<b><math>\gamma</math>-PROTEOBACTERIA</b>		
<i>Arsenophonus nasoniae</i>	MK	<i>Nasonia vitripennis</i> (Hymenoptera: Pteromalidae)
<b>BACTEROIDETES</b>		
<i>Cardinium hertigii</i>	CI F P	<i>Encarsia pergandiella</i> (Hymenoptera: Aphelinidae) <i>Eotetranychus suginamensis</i> (Acari: Tetranychidae) <i>Brevipalpus</i> spp (Acari: Tenuipalpidae) <i>Encarsia</i> spp (Hymenoptera: Aphelinidae) <i>Aspidiotus nerii</i> (Hemiptera: Diaspididae)
<i>Flavobacterium</i> sp.	MK	<i>Adonia variegata</i> (Coleoptera: Coccinellidae) <i>Coleomegilla maculata</i> (Coleoptera: Coccinellidae)
<b>MOLLICUTES</b>		
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	MK	<i>Adalia bipunctata</i> (Coleoptera: Coccinellidae) <i>Anisosticta novemdecimpunctata</i> (Coleoptera: Coccinellidae) <i>Harmonia axyridis</i> (Coleoptera: Coccinellidae) <i>Danaus chrysippus</i> (Lepidoptera: Nymphalidae)
<i>S. poulsonii</i>	MK	<i>Drosophila willistoni</i> group (Diptera: Drosophilidae)

**CI: Incompatibilidad citoplasmática; F: Feminización de los machos;  
P: Partenogénesis; MK: Muerte selectiva de los machos**

Tabla 1: Tomada de Duron *et al.* (2008a), en la que se nombran algunos ejemplos de endosimbiontes asociados a alteraciones en la reproducción de su hospedador.

Para la caracterización de esta diversidad se han desarrollado técnicas moleculares como por ejemplo la PCR-DGGE, o PCR conjugada con una electroforesis en gel con gradiente



desnaturalizantes (“*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*”). Esta técnica combina la amplificación con *primer* generales, por ejemplo para el gen *16S rRNA*, seguida de una electroforesis en gel de acrilamida en gradiente desnaturalizante. Esto permite la separación de los amplificados en función de su tamaño y su composición nucleotídica, permitiendo en teoría incluso distinguir variantes que difieren en una sola posición (Carmona *et al.*, 2012). La posterior secuenciación de las bandas individuales permite una caracterización de la diversidad bacteriana de una determinada muestra (Bodilis *et al.*, 2012; Sant’Anna *et al.*, 2012). Sin embargo, las nuevas técnicas de secuenciación o *Next-Generation Sequencing Technologies*, están permitiendo un análisis más exhaustivo de muestras complejas, en las que existe una elevada diversidad bacteriana (Pires *et al.*, 2012; Kittelmann *et al.*, 2013; Oberauner *et al.*, 2013).

El análisis filogenético del gen *16S rRNA* de *Wolbachia* muestra la presencia de los supergrupos B y F de *Wolbachia* infectando a las distintas poblaciones analizadas del ortóptero (Martínez *et al.*, 2009; Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Sin embargo, la coexistencia de *Wolbachia* con otros endosimbiontes que potencialmente pudieran infectar a *Chorthippus parallelus* no ha sido analizada hasta ahora (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b), siendo relevante confirmar o descartar esta posibilidad a la hora de analizar el papel de estos microorganismos en la dinámica de la zona híbrida. Estudios previos realizados por Dillon *et al.* (2008) habían analizado mediante PCR-DGGE la diversidad bacteriana presente en el aparato digestivo de *C. parallelus*, detectando una escasa diversidad que incluía a *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. y *Wolbachia* sp. Nuestro estudio amplía el tamaño muestral con el fin de caracterizar la diversidad bacteriana asociada a este ortóptero, concretamente a posibles endosimbiontes que junto con *Wolbachia* puedan coinfectar a este organismo. Para ello nos centraremos preferentemente en la microbiota que afecta a las gónadas del ortóptero.

## 9.1 *Spiroplasma*.

El género *Spiroplasma* esta constituido por bacterias Gram-positivas, helicoidales y sin pared celular. Muchas de las especies que constituyen el género, son patógenos vegetales, como por ejemplo *Spiroplasma kunkelii* y *Spiroplasma citri* (Bové, 1997), sin embargo existe un amplio grupo de bacterias endosimbiontes de artrópodos (Gasparich *et al.*, 2004).

En relación al tipo de interacción que se establece entre endosimbionte y hospedador, podemos considerar a esta bacteria mutualista (Ebbert, 1991), patógena o parásita. De hecho existen numerosos casos en los que la presencia de esta bacteria ha sido relacionada con la muerte selectiva de embriones machos, alterando pues el *sex-ratio* de la especie de artrópodo a





la que parasita (Anbutsu & Fukatsu, 2003; Montenegro *et al.*, 2005; Tinsley & Majerus, 2006a; Bentley *et al.*, 2007; Haselkorn *et al.*, 2009; Anbutsu & Fukatsu, 2010; Anbutsu & Fukatsu, 2011). Sin embargo, se han descrito numerosas cepas infectando artrópodos cuyo fenotipo se desconoce (Kageyama *et al.*, 2006) e incluso, cepas cuyo fenotipo depende del genotipo del hospedador (Kageyama *et al.*, 2007).

Se han detectado cepas de *Spiroplasma* causantes de muerte selectiva de machos en numerosas especies de *Drosophila*, incluidas *D. melanogaster*, *D. willistoni*, *D. nebulosa*, *D. paulistorum*, y *D. equinoxialis*, *D. ornatifrons*, *D. neocardini*, y *D. paraguayensis*. Por otro lado, se han descrito cepas de *Spiroplasma* que no inducen este fenotipo en *D. hydei*, *D. aldrichi*, *D. mojavensis*, *D. wheeleri*, *D. tenebrosa*, *D. simulans*, *D. aripex*, y *D. ananassae* (Mateos *et al.*, 2006; Haselkorn *et al.*, 2009; Watts *et al.*, 2009b; Haselkorn, 2010). Además, los estudios filogenéticos realizados muestran que ambos tipos de cepas están muy relacionadas entre sí, pese a la diferencia de fenotipos, hecho sin duda sorprendente (Montenegro *et al.*, 2005; Kageyama *et al.*, 2006).

Esto hace necesario profundizar en el conocimiento de la diversidad de esta bacteria con el fin de valorar sus posibles efectos en los hospedadores y en qué medida afecta a su *fitness* (Haselkorn, 2010; Martins *et al.*, 2010; Toju & Fukatsu, 2011; Ventura *et al.*, 2012). Por otro lado, dichos estudios permitirían establecer cuán antigua es la relación entre hospedadores y endosimbiontes, y hasta qué punto se han producido fenómenos de coevolución entre ambos organismos, como ha ocurrido en otros casos (Tamas *et al.*, 2002).

## 9.2 Detección de endosimbiontes mediante FISH.

Junto a esta metodología, se ha implementado una variante de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) denominada *Whole Cell Hybridization* (WCH) que permite la detección filogenética de muestras bacterianas complejas, sin necesidad de cultivo previo (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995; Pernthaler *et al.*, 2001). Las sondas empleadas son oligonucleótidos marcados que están diseñados para unirse a las múltiples copias de ARNr (o ARNm específico) presente en el citoplasma bacteriano, lo que garantiza una alta emisión fluorescente (Trebesius *et al.*, 2000).

Las nuevas técnicas de secuenciación han incrementado el número de secuencias del gen *16S rRNA* disponibles en las bases de datos (Ludwig & Schleifer, 1994; Cole *et al.*, 2009), lo que facilita el diseño de sondas específicas para distintas bacterias. A su vez, nuestro conocimiento sobre la estructura secundaria del ARNr permite seleccionar sus zonas más



expuestas, incrementando la efectividad de la hibridación (Keswaniã & Whitman, 2001; Hugenholtz *et al.*, 2002). La especificidad de la técnica depende de las condiciones de hibridación y lavado de la muestra. En general las muestras se incuban en condiciones saturantes de sonda a altas temperaturas (48-50°C), para facilitar la hibridación y posteriormente se lavan a una temperatura ligeramente superior para eliminar el exceso de sonda. Este es el punto más importante de la técnica y el que establece que la hibridación sea específica (Pernthaler *et al.*, 2001).

Su simplicidad, y a la vez especificidad, ha permitido emplear esta técnica para analizar las comunidades bacterianas y estudiar su dinámica en su hábitat, incluyendo muestras ambientales como *biofilms* (Souza-Egipsy *et al.*, 2008), muestras de agua (García-Moyano *et al.*, 2007), e incluso muestras de sangre (Jansen *et al.*, 2000), o muestras de tejido fijadas y embebidas en parafina (Bojesen *et al.*, 2003; Conord *et al.*, 2008).

La optimización de esta metodología para el estudio de las comunidades de endosimbiontes en cortes de tejido de *C. parallelus*, así como su adaptación para la detección de *Wolbachia* en aplastados de testículo han sido planteadas como objetivos de este trabajo de investigación. Se pretende aportar datos sobre la densidad bacteriana, su distribución celular y tisular o las relaciones espaciales entre varios endosimbiontes que infecten a un mismo hospedador, complementando la detección mediante PCR (Heddi *et al.*, 1999; Gomez-Valero *et al.*, 2004).

## **10 TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE WOLBACHIA.**

Como hemos comentado, la transmisión de este endosimbionte es fundamentalmente materna, a través del citoplasma de los huevos. Sin embargo uno de los resultados más reveladores de los estudios filogenéticos realizados en el género *Wolbachia*, es la incongruencia entre la filogenia de este género bacteriano y la de sus hospedadores. Esto ha sido interpretado tradicionalmente como la posibilidad de que *Wolbachia* se transmita horizontalmente entre un hospedador a otro, esto es que la bacteria tenga la capacidad de invadir una especie *de novo* (Vavre *et al.*, 2009). Actualmente, no existen dudas sobre si existe o no transmisión horizontal: son muchos los datos que apoyan su existencia; sin embargo, la pregunta de cómo se produce este fenómeno sigue abierta. Entender los mecanismos que permiten esta transferencia entre especies, puede ser considerada una de las principales preguntas sobre la biología de *Wolbachia* (Vavre *et al.*, 1999c). A su vez, se ha propuesto en varios estudios la posibilidad de que los fenómenos de transmisión horizontal jueguen un papel importante en la dinámica de expansión



de la infección entre taxones, por lo que son necesarios estudios de campo que permitan valorar realmente su importancia (Heath *et al.*, 1999b; Vavre *et al.*, 1999c; Huigens *et al.*, 2004; Haine *et al.*, 2005b; Baldo *et al.*, 2008; Vavre *et al.*, 2009a; Stahlhut *et al.*, 2010; Kraaijeveld *et al.*, 2011; Kremer & Huigens, 2011; Watanabe *et al.*, 2012).

Son varios de los mecanismos propuestos para explicar cómo podría producirse la transmisión horizontal de este endosimbionte entre taxones, teniendo en cuenta la limitación de esta bacteria para sobrevivir fuera de su hospedador (Rasgon *et al.*, 2006b). Rigaud & Juchault (1995) propusieron que las relaciones depredador-presa o las heridas provocadas en enfrentamientos entre individuos podían ser una vía de transmisión horizontal de la infección. De hecho, estos autores demostraron que el isópodo *Armadillidium vulgare* podía infectarse *de novo* por *Wolbachia* través de la sangre, tras haber sufrido una herida. Sin embargo, una de las vías más citadas para la transmisión horizontal de *Wolbachia* entre taxones son los sistemas de interacción insecto-parasitoide, en los que la relación íntima que se establece entre parasitoides y su insecto hospedador podría facilitar esta transmisión (Werren *et al.*, 1995; Vavre *et al.*, 1999c; Haine *et al.*, 2005b; Vavre *et al.*, 2009).

Muchas especies de parasitoides inyectan sus huevos en el hemocoele del hospedador o en su caso, en un determinado órgano diana, donde éstos se desarrollan. En principio, esto permitiría que durante el desarrollo, el parasitoide podría infectarse por la cepa de *Wolbachia* que infectara al hospedador (Godfray, 1994). Otra hipótesis respecto a la vía de transmisión en la infección entre varios hospedadores, sería la conocida como hipótesis “dirty-needle”, por la cual un parasitoide que acabase de inyectar sus huevos en un hospedador infectado, podría transmitir esta enfermedad al próximo hospedador al que parasite, y viceversa (Houck *et al.*, 1991).

Estas hipótesis se soportan en la caracterización molecular de cepas muy próximas de *Wolbachia* en varios hospedadores y en sus parasitoides (Schilthuisen & Stouthamer, 1997; Plantard *et al.*, 1998; West *et al.*, 1998; Vavre *et al.*, 1999). En este sentido, cabe destacar uno de los primeros casos descritos, en el que cepas prácticamente idénticas de *Wolbachia* fueron detectadas en la avispa parásita *Nasonia giraulti* y su parasitoide *Proticalliphora* (Werren *et al.*, 1995). Un caso particularmente interesante, son aquellos sistemas en los que se han detectado cepas próximas de *Wolbachia* en diversos parasitoides que afectan a su vez a varios hospedadores relacionados filogenéticamente. En este sentido, estos estudios analizan el fenómeno de transmisión horizontal a nivel de *comunidad*. Estos sistemas podrían constituir “redes de transmisión” de la infección de especial interés para conocer la dinámica de expansión de la infección. Por ejemplo, los estudios realizados en el género *Drosophila* y sus avispas

parasitoides (Vavre *et al.*, 1999; Vavre *et al.*, 2009). En general, se esperaría que la transmisión por *Wolbachia* fuese más frecuente entre especies próximas, si bien la transmisión entre especies lejanas podría darse en menor frecuencia (West *et al.*, 1998).

En el caso de *Drosophila*, cabe destacar que alrededor de un 69% de sus parasitoides están infectados por *Wolbachia* (Vavre *et al.*, 2009), observándose que en la mayoría de los casos, la infección está fijada, o próxima a la fijación. También se han detectado algunos casos de polimorfismo en relación a la infección, esto es, coexistencia de individuos infectados y no infectados, como por ejemplo en las especies *Leptopilina victoriae* y *Pachycrepoideus dubius* (Vavre *et al.*, 2000; 2002). A su vez, cabe destacar la existencia de infecciones múltiples en estas especies, por ejemplo *Trichopria sp.* *Drosophila* está infectada de forma simultánea por tres cepas distintas de *Wolbachia* (Vavre *et al.*, 1999). Estas redes, por tanto, pueden suponer una vía importante de transmisión. Tengamos en cuenta que se estima que un 8.5% de las especies de insectos han adquirido este estilo de vida parásito (Godfray, 1994). Algunos trabajos, como el realizado por Lasalle & Gauld (1991), proponen que al menos un 20% de las especies de insectos poseen esta forma de vida.

La direccionalidad de la transmisión de *Wolbachia* es importante a la hora de analizar este fenómeno. Generalmente se propone que la transmisión de la infección se produzca desde un hospedador infectado, hacia un parasitoide no infectado. Este argumento suele basarse en que la infección por un endoparasitoide es generalmente mortal para el hospedador, por lo que la infección no podría fijarse en la nueva especie. Sin embargo, en ciertos casos, el sistema inmune del hospedador podría encapsular al parasitoide, por lo que el hospedador sobreviviría. En estas circunstancias, no podemos descartar la potencial bidireccionalidad de la transmisión (West *et al.*, 1998), si bien el propio encapsulamiento del parasitoide en desarrollo dificultaría a las células de *Wolbachia* infectar el tejido del hospedador desde un parasitoide infectado, y viceversa (Hughes *et al.*, 2004; Vavre *et al.*, 2009a). Otros autores sin embargo sugieren que esto no debería suponer un problema, debido a la capacidad de la bacteria para invadir distintos tejidos (Hadfield & Axton, 1999; Ferree *et al.*, 2005; Frydman *et al.*, 2006).

En general, para que pueda aparecer una infección *de novo* a partir de otra especie infectada previamente por *Wolbachia*, deben superarse con éxito varias etapas:

- (i) En primer lugar, es necesario un contacto íntimo entre la especie infectada y aquella que será infectada. Esta barrera física puede superarse en sistemas como los que hemos descrito, en los que existe un contacto íntimo entre el parasitoide y el hospedador en el que se está desarrollando.



- (ii) A su vez, a la hora de considerar un fenómeno de transmisión horizontal tendremos que tener en cuenta las limitaciones derivadas de la adaptación de *Wolbachia* a un entorno celular concreto, el de su hospedador, y la necesidad de adaptarse rápidamente al entorno celular de la especie a la que infecte *de novo*. Este proceso puede observarse experimentalmente en los estudios de transfección entre especies (ONEILL *et al.*, 1997; Noda *et al.*, 2002; Kubota *et al.*, 2005; Xi *et al.*, 2005; Dobson, 2007).
- (iii) A continuación, y en el caso de que la bacteria sea capaz de sobrevivir en este nuevo entorno celular, tendrá que poder transmitirse verticalmente de forma efectiva a la siguiente generación. Por ejemplo, el experimento llevado a cabo por Heath *et al.* (1999) demostró en *Leptopilina boulardi* que tras la transfección de *Wolbachia* a esta nueva especie, la infección se perdía en la generación F4. Los motivos por los cuales puede ocurrir este fenómeno son desconocidos, pero podrían estar relacionados con la necesidad de que la bacteria esté sincronizada con la ovogénesis de la especie receptora. La asincronía se podría traducir en un alto número de huevos libres de bacterias (Heath *et al.*, 1999).
- (iv) Y finalmente, *Wolbachia* deberá ser capaz de traspasar el umbral de infección necesario para permitir su fijación, o al menos el mantenimiento del polimorfismo a nivel poblacional, en la nueva especie (Turelli, 1994).

El papel de *Wolbachia* en la interacción entre hospedadores y parasitoides merece un punto de atención por nuestra parte, dado que puede modificar dicha interacción. Existen varios estudios en *Leptopilina heterotoma* que muestran que la infección por *Wolbachia* en este parasitoide podría alterar parcialmente la capacidad motora de esta especie, lo que puede suponer un alto coste a nivel de *fitness* (Fleury *et al.*, 2000). A su vez se ha observado que la infección por *Wolbachia* en el parasitoide favorece el encapsulamiento de los huevos de éste en el hospedador, lo que dificulta la reproducción del parasitoide (Fytrou *et al.*, 2006). Otros estudios muestran que *Drosophila* es más susceptible al ataque de parasitoides si está infectada por *Wolbachia* (Fytrou *et al.*, 2006).

### 10.1 Nematomorpha.

El *Phylum* Nematomorpha es el grupo hermano del *Phylum* Nematoda, si bien presenta características propias, tales como la forma del cuerpo, la coloración, las características de la cutícula y la organización corporal (Dunn *et al.*, 2008). En general, todos los miembros de este



grupo son parásitos en sus estadios juveniles, pero son especies de vida libre en su estadio adulto. A su vez, debido a su estilo de vida parásito, el estómago es en gran medida no funcional y los juveniles absorben materiales directamente de su hospedador (Inoue, 1959; Kirjanova, 1959; Rajaram & Rajulu, 1975a).

El ciclo de estos organismos involucra formas de vida parásitas que se desarrollan en un hospedador artrópodo, como por ejemplo *C. parallelus*, así como otra de vida libre que se desarrollan habitualmente en entornos acuáticos. La transición entre ambos estadios requiere que el hospedador entre en contacto con este medio acuático. Para ello, se ha descrito que el nematomorfo puede inducir comportamientos suicidas en su hospedador, que salta al agua y muere, de tal forma que el nematomorfo pueda salir del hospedador y completar su ciclo de vida (Thomas *et al.*, 2002; Biron *et al.*, 2006).

Las especies pertenecientes a la clase Gordidae (Nematomorpha) y asociados a agua dulce, generalmente se reproducen y ponen sus huevos fuera de su hospedador (Hanelt *et al.*, 2005). Existe un marcado dimorfismo sexual y en general, se puede observar a estos organismos en hábitats cercanos a torrentes y cursos de agua, pequeños lagos y zonas encharcadas. Estos cursos de agua estacionales, permiten a los individuos concentrarse en un espacio reducido que favorezca el encuentro y el apareamiento. Se pueden observar en estos hábitats como madejas de hilo, debido a que hembras y machos tienden a enmarañarse durante la reproducción, en lo que se asemeja a un ovillo o un nudo muy enredado, también referido como nudo gordiano (de ahí su nombre) (Thorne, 1940). Los hospedadores habituales de estos parasitoides incluyen insectos hemimetábolos como los ortópteros (grillos, saltamontes y langostas), cucarachas y mántidos, pero también insectos holometábolos, como los escarabajos (Schmidt-Rhaesa, 1997).

Se ha especulado sobre la posible infección por *Wolbachia* en la clase Gordidae. Hasta la fecha se ha testado sin éxito la infección por *Wolbachia* en cuatro especies: *Paragordius tricuspidatus*, *Spinochordodes tellinii*, *Gordius robustus* y *Paragordius obamai* (Duron & Gavotte, 2007; Hudson & Floate, 2009; Hanelt *et al.*, 2012). A su vez, Hudson & Floate (2009) descartaron la presencia de otros endosimbiontes o bacterias en las muestras de *Gordius robustus*. La ausencia de bacterias asociadas a esta especie se explicó por el estilo de vida de estos parásitos, que no se alimentan del medio (de hecho su estómago no es funcional), sino de sus hospedadores, y por tanto no tendrían contacto mediante la dieta con esta flora/fauna característica de la mayoría de insectos (Rajaram & Rajulu, 1975). Recientemente, el estudio de Hanelt *et al.* (2012) mediante tecnología de secuenciación 454, descartó también la presencia de *Wolbachia* en *Paragordius obamai*, pero describió la presencia de otras bacterias, de los géneros *Rickettsia*, *Arsenophonus*, y *Flavobacterium*.



Se desconoce el motivo por el cual *Wolbachia* aparentemente no infecta a este taxón. De hecho este *Phylum* habría coexistido con sus hospedadores desde hace aproximadamente 110-100 millones de años. Se han encontrado fósiles de nematomorfos en el interior de hormigas, mosquitos, quironómidos, insectos hoja y arañas que quedaron atrapado en el ámbar fósil (Poinar Jr & Buckley, 2006). Algunas de las propuestas para explicar que pese al contacto íntimo entre especies no se haya producido la infección, ha sido la presencia de otras bacterias asociadas a este *Phylum*, tales como *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, productoras de antibióticos y que pudieran limitar la transmisión horizontal entre taxones. Sin embargo, esta explicación no sería satisfactoria en muchas especies de nematomorfos, donde no se ha detectado la presencia de estas bacterias (Duron & Gavotte, 2007). Como hemos comentado Hanelt *et al.* (2012) describieron mediante tecnología de secuenciación 454 la presencia de una rica flora bacteriana en estos organismos. Este estudio descarta que la presencia de otras bacterias productoras de antibióticos determine la presencia de endosimbiontes.

El trabajo de Duron & Gavotte (2007) concretamente estudió la infección por *Wolbachia* en los nematomorfos *Spiniochordotes tellinii* y *Paragordius tricuspidatus* detectados en los hospedadores *Nemobius sylvestris* (Orthoptera, Familia: Gryllidae) y *Pholidoptera griseoptera* (Orthoptera, Family: Tettigoniidae) en distintas poblaciones francesas. En este caso se descartó la presencia de esta bacteria mediante un ensayo de PCR para los genes *16S rRNA* y *wsp* de *Wolbachia*. Cabe destacar que el tamaño muestral del estudio respecto al número de nematomorfos fue escaso. Concretamente se analizaron 10 individuos de *Paragordius tricuspidatus*, localizados en 5 hospedadores distintos, y solo 2 individuos de *Spiniochordotes tellinii*, a su vez localizados en 2 ortópteros. Este escaso tamaño muestral no puede descartarse como la causa de los resultados negativos en estas especies. De hecho, generalmente se ha sugerido que la infección por *Wolbachia*, así como otros endosimbiontes, puede estar infra-estimada en la bibliografía (Hilgenboecker *et al.*, 2008a; Zug & Hammerstein, 2012), dado que normalmente la mayoría de los estudios suelen basarse en un número muy reducido de individuos, incluso en muchos casos 1 único espécimen por especie. Esto unido a que los rangos de incidencia de *Wolbachia* en poblaciones naturales varía desde el 1% a la fijación, dependiendo de la especie, y que los sistemas de detección por PCR estándar (frente a la mayor eficiencia de la *nested-PCR*) presentan un índice preocupante de falsos negativos como consecuencia de las bajas densidades bacterianas existentes en algunos hospedadores, hace difícil detectar la presencia de estos endosimbiontes sin que se realicen estudios más amplios (Augustinos *et al.*, 2011).



## 10.2 Tachinidae.

Los tachínidos, son una amplia familia dentro del orden Diptera, en donde se han descrito entre 9,200 (Brown, 2001) a 10,000 (Irwin *et al.*, 2003) especies, tratándose de la segunda familia de dípteros mas abundante. Como parasitoides, se trata del segundo conjunto más abundante, tras el amplio grupo de avispas parasitoides, tanto en diversidad como en importancia ecológica (Godfray, 1994; Stireman & Singer, 2003; Stireman, 2008).

Se trata de parásitos proteleanos, esto es artrópodos parásitos cuyo ciclo de vida comprende un estadio larvario parásito, y un estadio adulto de vida libre. Su rango de hospedadores es muy amplio, entre los cuales se pueden destacar larvas y adultos de distintos órdenes de la clase Insecta, tales como Lepidoptera, principalmente las familias Arctiidae, Noctuidae, Sphingidae y Nymphalidae (Gentry & Dyer, 2002; Stireman & Singer, 2003; Janzen & Hallwachs, 2006), así como los órdenes Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera y Dermaptera. Incluso estos parasitoides pueden infestar especies de la clase Myriapoda, orden Geophilomorpha (Arnaud, 1978; Soto & Ocampo, 2011).

Como características anatómicas destacables, mencionar que los adultos pueden medir entre 2 y 20 mm y presentan todo tipo de morfologías y coloraciones (Wood, 1987; Ohara & Wood, 2004). Existen especie ovivíparas, ovilarvíparas y micro-ovolarvíparas, que en todos los casos conocidos son parásitas de otros artrópodos. El mecanismo por el cual introducen sus huevos en el hospedador es propio de cada especie y puede ser realmente complejo (Wood, 1987). Tras el desarrollo de los huevos, generalmente emerge una única larva del hospedador, si bien se han descrito casos de multiparasitismo. Como casos extremos, de la especie *Eubomyia calosomae* se han descrito hasta 16 adultos emergiendo de un único individuo del escarabajo *Calosoma* sp. En la especie *Palpostoma subsessilis* emergen como media 28 moscas por escarabajo. Finalmente, en la especie *Achaetoneura samiae* se han detectado hasta 110 moscas emergentes de un individuo de *Samia* sp. (Nakano *et al.*, 2002). Cuando se producen fenómenos de superparasitismo, generalmente las larvas se eliminan unas o otras (Madrigal, 1999). La larva puede emerger a través del ano, o bien a través de la membrana cervical, decapitando al insecto (Soto, 2002).

En el caso de los ortópteros, se han detectado numerosos géneros infectando a la familia Acrididae, a la que pertenece *C. parallelus*. Entre ellos, distintas especies de la Subfamilia Goniinae, incluyendo (i) La tribu Acemyini: géneros *Acemya* (*Acemya tibialis*), *Ceratia* (*Ceratia dentata*), *Hemithrixion* (*Hemithrixion oestriforme* y *Hemithrixion plamkii*); (ii) La tribu Trichopodini, incluyendo al género *Trichopoda* (*Trichopoda plumipes*, *Trichopoda trifasciata*,





*Trichopoda radiata* y *Trichopoda subdivisa*), (iii) y la tribu Cylindromyiini, con el género *Cylindromyia* ( *Cylindromyia carilnae* y *Cylindromyia euchenor*) (Arnaud, 1978).

Dentro de esta familia, se conoce el caso de la infección por *Wolbachia* de la especie *Exorista sorbillans*, a su vez parásita del gusano de seda *Bombyx mori* (Puttegowda & Madhu, 2001; Puttaraju & Prakash, 2005b; Guruprasad *et al.*, 2011a; Guruprasad *et al.*, 2011b).



## OBJETIVOS.

- (i) Caracterización de las frecuencias de infección por *Wolbachia* en distintas poblaciones de *C. parallelus*, tanto de la Península Ibérica, como de otras regiones europeas.
- (ii) Profundizar en los estudios de variación interanual de la infección en las poblaciones muestreadas en la zona híbrida de *C. parallelus*.
- (iii) Efectuar un análisis intra-generacional de la infección por *Wolbachia* en poblaciones de *C. parallelus*, evaluando las posibles variaciones en los niveles de infección lo largo del ciclo de vida de nuestro organismo modelo.
- (iv) Valorar, mediante modelización matemática, la importancia de la variación intra-anual en la dinámica de la infección por *Wolbachia*.
- (v) Caracterización y clasificación mediante MLST de las distintas cepas del género bacteriano *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus*.
- (vi) Establecer la filogenia del género *Wolbachia* en base al gen *16S rRNA* y a los genes integrantes del MLST, incorporando las cepas detectadas en *C. parallelus*.
- (vii) Realizar un estudio preliminar de las relaciones filogeográficas entre las diferentes cepas bacteriana detectadas, y las poblaciones de *C. parallelus*.
- (viii) Evaluar la importancia de la variabilidad bacteriana detectada y su localización geográfica en la dinámica de la zona híbrida de *C. parallelus*.
- (ix) Analizar la comunidad de endosimbiontes que afecta a *C. parallelus*, valorando el papel que otros endosimbiontes puedan tener en la reproducción de este organismo.
- (x) Localizar mediante FISH la infección por *Wolbachia* y otros endosimbiontes en muestras de tejido de *C. parallelus*, así como en aplastados de testículo.
- (xi) Estudiar la infección por *Wolbachia* en parasitoides naturales de *C. p. erythropus*, como posibles vectores de transmisión horizontal de la bacteria en poblaciones naturales.



# MATERIAL Y MÉTODOS.

## 11 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Aproximadamente 6.600 individuos de ambos sexos de *Chorthippus parallelus* (Fig. 7) fueron muestreados en diferentes poblaciones europeas durante los veranos de los años 2007, 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012. Estos muestreos completaron los previos realizados desde el año 2002 (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). En total, y dependiendo del tipo de análisis, se dispone de resultados de hasta 10.000 individuos (aprox.). Los detalles de tales muestreos, sus coordenadas geográficas, así como el tamaño muestral de cada población, año de captura y otros pormenores pueden consultarse en la Tabla B1 del anexo B (ver también Figs. 25 y 26).

En primer lugar, se muestrearon anualmente las poblaciones incluidas en el transecto de la zona híbrida de este ortóptero, continuando y ampliando las capturas comenzadas en 2002. De igual modo, se muestrearon otras poblaciones europeas e ibéricas no analizadas hasta el momento (ver anexo C). A su vez, durante el año 2012 se capturaron varias especies de ortópteros (incluyendo *Antaxius chopardi* (Tettigoniidae), *Arcyptera fusca*, *Podisma pedestris*, *Oedipoda caerulescens*, *Oedipoda germanica*, *Ruspolia nitidula*, *Chorthippus vagans*, y *Euchorthippus chopardi*...) en las poblaciones de Arudy, C. Tourmont y Escarrilla (ver figura Fig. 8). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se estudiaron las comunidades bacterianas de otros taxones, como por ejemplo el género *Messor* (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013c), así como varias especies de fásquidos en el marco del proyecto fin de carrera de M<sup>a</sup> Mar Pérez. Estos datos no han sido incluidos en la memoria.

Dichos muestreos fueron posibles gracias a la colaboración de otros miembros del proyecto de investigación: Dr. José L. Bella, Francisca Arroyo-Yebras, Mario Zabal-Aguirre, Dr. Jonás Sarasa, Dra. Begoña Fernández, Dra. Joaquina de la Torre y Dr. Miguel Pita. Las poblaciones procedentes de Alpes, y Navarra se muestrearon con la colaboración de Javier Barbado, y la de Bubión, con la del Dr. Juan P. Martínez Camacho (Universidad de Granada, Depto. de Genética). Las poblaciones alemanas fueron facilitadas por el Dr. Günter Köhler (Friedrich-Schiller-University, Institute of Ecology), las poblaciones noruegas por el Dr. Snorre Stuen (Norwegian School of Veterinary Science, Department of Production Animal Clinical Sciences), las poblaciones procedentes de UK por el Dr. Roger K. Butlin (University of Sheffield, Department of Animal and Plant Sciences) y finalmente la población de Eslovenia fue muestreada por el Dr. Rok Kostanjšek (Univerza v Ljubljani, Department of Zoology ).

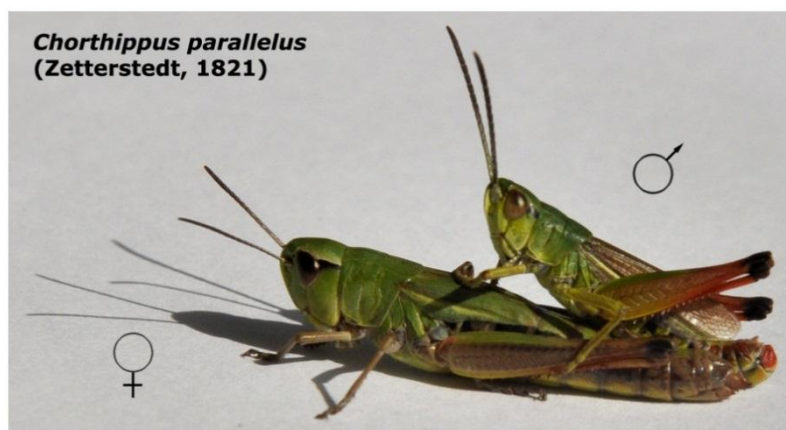


Fig. 7: Fotografía de Individuos macho y hembra de *C. parallelus*.

Otro de nuestros objetivos fue el estudio la dinámica intrageneracional de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*. Para ello durante el año 2005 se realizaron tres muestreos a lo largo del verano, durante los meses de julio, agosto y septiembre, en la población de Navafría, en el sistema central (NAV; 42° 45' 53.31"N; 0° 20' 25.34"W, 1710 m; n = 283). Estos muestreos se repitieron durante el verano de 2007 en la población pirenaica de Sallent de Gállego, Huesca (SAL; 42° 45' 53.31"N; 0° 20' 25.34"W, 1343 m; n = 319) (ver Tablas B3 y B4 del anexo B, así como el anexo C).

Por otro lado, se dispuso de material muestreado en el año 2002 por el Prof. Günter Köhler (Friedrich-Schiller-University, Institute of Ecology), en la zona híbrida de *C. parallelus* del Col de La Quillane (Pirineos catalanes/franceses). Este material es especialmente valioso, debido a que se trata de parejas recolectadas durante la cópula. Su estudio, debido a las limitaciones que supone su mala conservación desde el año 2002, no ha permitido realizar el análisis de la infección mediante las técnicas expuestas a continuación. Para estas muestras en concreto, sin embargo, se está desarrollando una metodología alternativa (resultados no mostrados en esta tesis doctoral).

## 12 TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE *WOLBACHIA*.

En los casos en los que durante la disección de los individuos de *C. parallelus* se detectó la presencia de parasitoides en el abdomen del individuo, éstos fueron separados, y lavados con etanol 100% antes de ser fijados en etanol 100% de forma independiente a su hospedador. Parasitoide y hospedador en todo caso fueron etiquetados y quedaron asociados para el posterior análisis de la infección (ver siguiente sección).

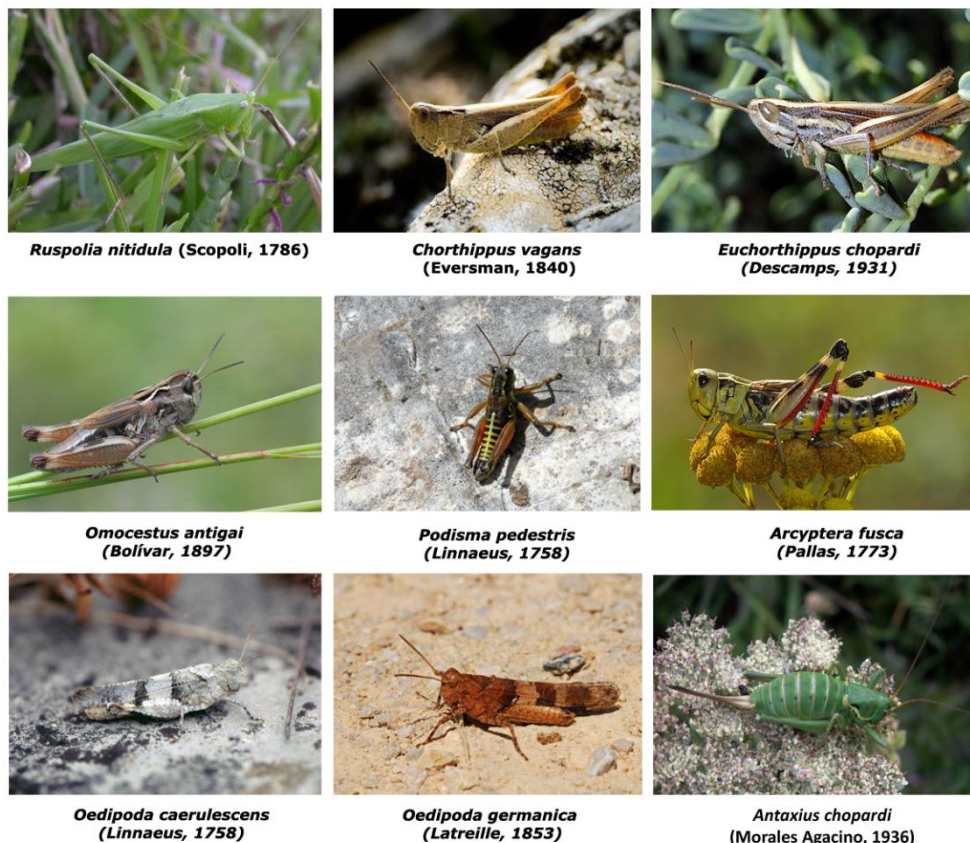
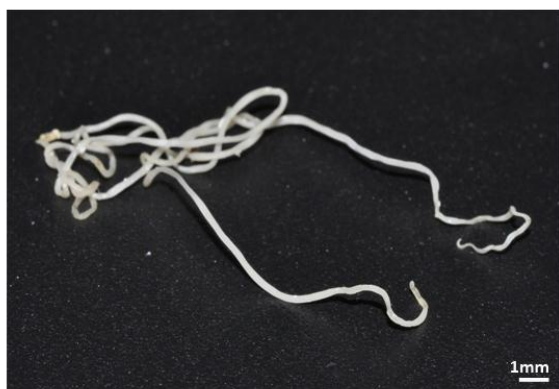


Fig. 8: Algunas de las especies de ortópteros muestreadas en el Pirineo, y Alpes. (<http://miradascantabricas.blogspot.com.es> ; <http://www.naturalezaaragonesa.com> ; <http://faluke.blogspot.com.es> ; <http://www.flickr.com/photos/jrcorreas> ; <http://www.fotonatura.org> ; <http://www.tagschmetterlinge.de> ; <http://www.bertusvanrooijen.nl> ; <http://tubiologia.foroactivos.net>).

Los especímenes fueron fotografiados mediante una cámara Nikon D90 y un objetivo TOKINA 100mm f/2.8 Macro. Su identificación fue llevada a cabo con la ayuda de la Dra. Ana García-Moreno (Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid). Se detectaron al menos dos especies de parasitoides (ver Fig. 9). La primera de ella se identificó en el nivel de familia, dada la dificultad de precisar el género y especie en estado larvario. Se describió como un miembro de la familia Tachinidae (Orden Diptera). En el segundo caso, se llegó a la conclusión de que se trataba de un miembro del *Phylum* Nematomorpha, también conocidos como gusanos de pelo de caballo, y que son parasitoides comunes de los ortópteros.

El material fue empleado en el estudio de posibles fenómenos de transmisión horizontal en nuestro sistema, analizando en ambos casos la infección *Wolbachia* de parasitoide y hospedador.



**Nematomorpha: Gordidae**



**Arthropoda: Tachinidae**

Fig. 9: Fotografía de parasitoides detectados en *C. parallelus*: a) Nematomorpha, b) Tachinidae

### 13 EXTRACCIÓN DE ADN.

La metodología empleada en la extracción de ADN puede consultarse en (Martínez *et al.*, 2009; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013c).

Una vez diseccionados los individuos, sus gónadas fueron fijadas en etanol 100% para la posterior extracción de ADN. En el caso de las larvas, sus cuerpos fueron fijados enteros.

Allí donde se requirió, la gónada de los individuos fue separada en dos mitades, una de ellas fue fijada como se ha descrito para la extracción de ADN, y la otra mitad en formaldehído para su inclusión en parafina y posterior procesamiento (ver apartado “Detección de endosimbiontes mediante FISH. pág. 47). De igual modo, en ciertos casos, la gónada de algunos machos fue separada en dos partes, siendo una mitad de la gónada fijada en etanol 100% y la otra en Carnoy (3 Etanol 100%: 1 Ac. acético glacial) para su análisis citogenético.

Tras su deshidratación, cada muestra fue disgregada mediante un molino Retsch MM 400 (Retsch GmbH). Para ello, y una vez evaporado completamente el etanol cada una fue introducida en un tubo eppendorf de 1,5 mL estéril, junto con pequeñas bolas de vidrio estériles de distintos tamaños. Los tubos, dispuestos en gradillas diseñadas para aguantar bajas temperaturas, fueron sumergidos durante al menos 1 minuto en nitrógeno líquido, y después colocados en el brazo mecánico del molino. La vibración de 20 pulsaciones/s durante dos bloques de 45 s cada uno, permite que las bolas de vidrio disgreguen el material biológico, dando como resultado un polvo muy fino, que puede ser disuelto en el *buffer* de extracción fácilmente.



La obtención de ADN fue realizada empleando la metodología estándar de “fenol/cloroformo”, con pequeñas modificaciones:

El polvo resultante de la trituración mecánica fue disuelto en 300 µl de TNEs (tris-HCl 50mM pH 8,25; NaCl 50 mM; EDTA 50 mM; SDS 1 %) en el caso de los machos, o 600 µl de TNEs en el caso de las hembras o cuerpos enteros (larvas), en función del distinto tamaño de las muestras. Esta suspensión fue incubada con 20 µl de proteinasa K (20 mg/mL) en el caso de las hembras, y 5 µl (20 mg/mL) en el caso de los machos, durante toda la noche a 37°C (*Roche*).

Tras la incubación, se añadió un volumen equivalente de fenol (*Acros Organics, Thermo Fisher Scientific*), los tubos se agitaron suavemente por inversión durante 2 min, y se centrifugaron durante 10 min a 8.000 rpm. A continuación se separó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril. La fase inferior, incluyendo las bolas de vidrio, fue descartada. A continuación, se añadió 1 volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) (*Schalau, Scharlab*) al sobrenadante. Los tubos se agitaron suavemente por inversión durante 2 minutos y se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 8.000 rpm. Una vez más, se separó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril. La fase inferior se descartó. Se añadió al sobrenadante 1 volumen de etanol 100% frío (conservado a -20°C), agitándose los tubos con suavidad por inversión hasta la visualización de la hebra de ADN (Fig. 10). A continuación los tubos se mantuvieron a -20°C hasta el día siguiente.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm. A continuación se descartó el sobrenadante volcando suavemente el etanol en un vaso de precipitados. Se añadieron 300 µl de etanol al 70% con el fin de lavar el ADN precipitado (ver Fig. 10). Los tubos se agitaron suavemente por inversión y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante volcando con suavidad el etanol en un vaso de precipitados. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente para favorecer la evaporación de los restos de etanol, hasta que no se detectaron restos en el *pellet*.

El ADN genómico fue resuspendido en 100 µl de tampón Tris-EDTA (TE) (Tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) en el caso de los machos, y en 200 µl de tampón Tris-EDTA en el caso de las hembras y cuerpos enteros (larvas), dada la alta concentración de ADN obtenida en los últimos casos. Para eliminar el ARN presente en la muestra, se incubaron las muestras con RNasa, libre de DNasa a 5 µg/mL (*Roche*) durante 2 h a 37°C.

A continuación, los ADNs fueron cuantificados mediante *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*). Se prepararon alícuotas de trabajo a 50ng/µL de cada muestra de ADN, y se conservaron los ADNs *stock* a -20°C para futuros experimentos.

En los casos en los que aparecieron parasitoides, éstos fueron tratados a efectos de extracción de ADN como machos de *C. parallelus*, debido a la cantidad de tejido a partir del cual se extrajo el ADN.

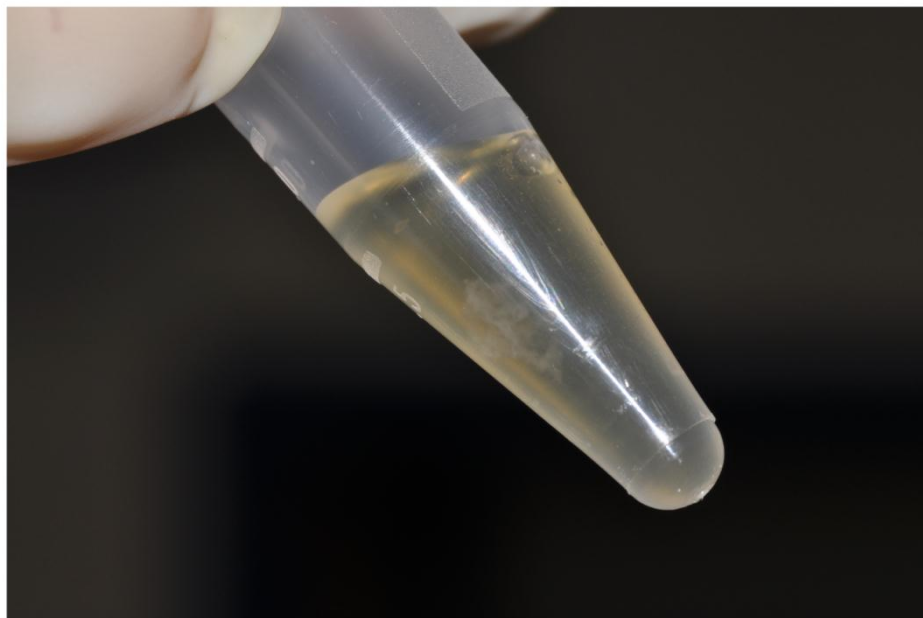


Fig. 10: Fotografía de una hebra de ADN tras la precipitación por etanol 100% frío, durante la extracción mediante fenol-cloroformo.

### 13.1 Extracción de ADN a partir de muestras incluidas en parafina.

En algunos casos, y para comprobar la idoneidad de esta metodología para futuros experimentos (por ejemplo, si se requiere analizar muestras fijadas existentes en distintas colecciones), se procedió a la extracción de ADN de individuos previamente incluidos en parafina. Estas extracciones, normalmente, suelen ser problemáticas debido a que el ADN obtenido puede estar muy fragmentado.

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo “en microondas” sugerido por Chan *et al.* (2001b). Varios cortes de tejido embebido se incubaron en 200  $\mu$ L de *buffer* de digestión, que contenía 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, and 0.5% Tween 20. Se irradiaron a máxima potencia (800w) en un horno microondas durante 1,5 minutos, en tramos de 15 segundos para evitar que hirviera en exceso. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a temperatura ambiente a 8.000 rpm. Tras la centrifugación, se formó un anillo de parafina sólida en la parte superior del tubo. Se eliminó este anillo de parafina, así como el sobrenadante

líquido, reservando el *pellet*. Se resuspendió el *pellet* en otros 200 µl de *buffer* de digestión, conteniendo 200 µg/mL de proteinasa K y se incubó a 56°C toda la noche. Tras centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos, el ADN debería estar disuelto en el sobrenadante, que se traspasó a otro tubo y se incubó durante 10 minutos a 95°C para desnaturalizar los restos de proteínas y la proteinasa K. El ADN se cuantificó y se conservó a -20°C para su uso posterior.

## 14 DETECCIÓN DE WOLBACHIA MEDIANTE PCR.

La detección de *Wolbachia* fue realizada mediante amplificación por *nested-PCR*, del gen *16S rRNA*, utilizándose para ello varias parejas de cebadores (Tabla 2).

En una primera PCR se utilizaron cebadores generales capaces de amplificar sobre cualquier cepa de *Wolbachia* (Giordano *et al.*, 1995) y a continuación, una PCR anidada, con un cebador “reverse” común y dos cebadores “forward” específicos para cada uno de los supergrupos previamente detectados (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013c). La consistencia, repetitividad y especificidad de la técnica fue comprobada mediante la secuenciación de los fragmentos obtenidos mediante PCR de varios individuos durante la optimización de la reacción.

La primera reacción de PCR fue ajustada a 25 µl, siendo sus condiciones: 1X *buffer*, 2 mM of Mg<sub>2</sub>Cl, 0.2 mM dNTP, 1,2 µM de cada cebador, 1.25 U de BIOTAQ ADN polimerasa (*Bioline*) y 100 ng de ADN genómico. La reacción se inició con un ciclo de 30s a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 1 min a 54°C, 1 min 30s a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y exposición a luz UV en transiluminador (*UVIdoc*, *Uvitec Cambridge*).

En todas las reacciones se realizaron los respectivos controles positivos y negativos. Para ello, como control positivo se empleó ADN procedente de individuos caracterizados previamente como infectados. En los controles negativos se sustituyó el ADN por H<sub>2</sub>O bidestilada (Milli Q®, *Millipore*), y posteriormente autoclavada.

A continuación, se emplearon 0,5 µL del producto de PCR de la primera reacción como molde para una segunda PCR anidada. La segunda reacción de PCR fue ajustada a 25 µL, siendo sus condiciones: 1X *buffer*, 2 mM of Mg<sub>2</sub>Cl, 0.2 mM dNTP, 1,2 µM de cada cebador (ver Tabla 2) y 1.25 U de BIOTAQ ADN polimerasa (*Bioline*). La reacción se inició con un ciclo de 30s a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 69°C, 1 min 30s a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C. En todas las reacciones se realizaron los respectivos controles positivos y negativos.

Debido al alto riesgo de contaminación que presentan las aproximaciones experimentales que utilizan PCRs anidadas o *nested*, fue necesario un control negativo adicional.



Este control consistió en una reamplificación en la segunda reacción, utilizando como molde el control negativo de la primera reacción de PCR. De este modo, podrán visualizarse contaminaciones indetectables en la primera ronda de amplificaciones, pero que sin embargo, se ponen de manifiesto tras la reamplificación. Cualquier reacción de PCR en la que se observara una banda en este control adicional, fue descartada y repetida.

Otras medidas adicionales para evitar las contaminaciones fueron trabajar siempre con puntas con filtro y, además, se reservaron dos estancias distintas para la manipulación de las mezclas de reacción (en campana de flujo laminar, y tras la descontaminación mediante luz ultravioleta) y los ADNs, y se trabajó con pipetas distintas para manipular ambos productos. Generalmente se comprobó que la primera reacción no estuviera contaminada antes de continuar con la reamplificación de todas las muestras mediante una PCR preliminar que incluía únicamente los controles positivos y negativos correspondientes, así como la reamplificación del control negativo de la primera reacción. Esta metodología evita malgastar tiempo y medios, por lo que es muy recomendable.

Los productos de PCR fueron visualizados, tal y como se realizó en la primera reacción, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y exposición a luz UV mediante un transiluminador (*UVIdoc*, *Uvitec Cambridge*).

## **15 CARACTERIZACIÓN DE *WOLBACHIA* MEDIANTE MLST.**

Siguiendo el protocolo descrito por Baldo *et al.*, (2006b) se amplificaron y purificaron los genes descritos en el Sistema de Clasificación Multilocus (*Multilocus strain typing system* o MLST) puesto a punto en el marco de esta tesis doctoral para las cepas bacterianas que infectan *C. parallelus*. Un análisis preliminar de este estudio puede consultarse en Bella *et al.* (2010). Las modificaciones sobre el protocolo inicial serán puntualizadas a continuación. Los genes seleccionados pueden consultarse en la Tabla 2.

La selección de estos genes se basó en su presencia común en el orden Rickettsiales, que son genes de copia única en el genoma de *wMel* (Cepa de *Wolbachia* caracterizada en *Drosophila melanogaster*), que su distribución parece ser homogénea por todo el genoma de la bacteria y la evidencia de que existe una fuerza selección estabilizadora dentro del género *Wolbachia* (Baldo *et al.*, 2006b). Estos criterios son estándar en cualquier MLST optimizado para otros géneros bacterianos. Así mismo, y como metodología complementaria al MLST, en nuestro caso se amplificó el gen codificante de la proteína de superficie *wsp* (*Wolbachia* surface protein).



Para la amplificación por PCR de estos genes se utilizaron varias parejas de cebadores, que pueden consultarse en la Tabla 2.

La consistencia y especificidad de la técnica fue comprobada mediante la secuenciación de los fragmentos obtenidos mediante PCR de varios individuos previamente caracterizados como “infectados” durante la optimización de la reacción.

Código	Gen	Proteína codificada	Primer		Tamaño de la secuencia
			Nombre	Secuencia (5'-3')	
Wp_16SA	16s rRNA	16s rRNA	16s_F	TTGTAGCTTGCTATGGTATAACT	1490
			16s_R	ACTGCTACCTTGTTACGACTT	
			Nested_R	TATCCCTTCGAATAGGTATGATT	750
			Nested_FF	TGAGCCTATATTAGATTAGCTAGT TGGTAAG	
			Nested_FB	GCCTATATTAGATTAGCTAGTTGG TGGA	
WD_0146	gatB	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit B	gatB_F1	GAKTAAAYCGYGCAGGBGTT	369
			gatB_R1	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	
WD_0301	coxA	Cytochrome c oxidase, subunit I	coxA_F1	TTGGRGCRATYAACCTTATAG	402
			coxA_R1	CTAAAGACTTTKACRCCAGT	
WD_0484	hcpA	Conserved hypothetical protein	hcpA_F1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	444
			hcpA_R1	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG	
WD_0723	ftsZ	Cell division protein	ftsZ_F1	ATYATGGARCATATAAARGATAG	435
			ftsZ_R1	TCRAGYAATGGATTGATAT	
WD_1238	fbpA	Fructose-bisphosphate aldolase	fbpA_F1	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	429
			fbpA_R1	CCRCCAGARAAAAYACTATTC	
WD_1063	wsp	Outer surface protein	wsp_F1	GTCCAATARSTGATGARGAAAC	546
			wsp_R1	CYGCACCAAYAGYRCTRTRAAA	

Tabla 2: Características de los *loci* seleccionados. Se muestran los códigos de los distintos *loci* en el genoma de *Wolbachia* (*Wmel*) respecto a las secuencias de referencia en la categoría correspondiente. El nombre de los primers utilizados y su secuencia. En el caso de la primera reacción de PCR para amplificar el gen *16S rRNA*, se emplearon los primers diseñados por Giordano et al. (1995). Así mismo se indica la longitud de nuestro amplificado (Tamaño de la secuencia amplificada).

La primera reacción de PCR fue ajustada a 50 µL, siendo sus condiciones: 1X *buffer*, 2 mM of Mg2Cl, 0.2 mM dNTP, 1,2 µM de cada cebador, 1.25 U de BIOTAQ ADN polimerasa (Bioline) y 100 ng de ADN genómico. La reacción se inició con un ciclo de 30s a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 1 min a 54°C (en el caso de los genes *hcpA*, *gatB*, *ftsZ* y *coxA*, y 59°C en

el caso de los genes *fbpA* y *wsp*), 1 min 30s a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2 % (con el fin de visualizar posibles bandas secundarias antes de la secuenciación del producto de PCR), tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y exposición a luz UV mediante el transiluminador (*UVIdoc*, *Uvitec Cambridge*).

En los casos en los que el producto de PCR se seleccionó para su secuenciación, éste fue purificado. En la mayoría de los casos, el producto de PCR fue directamente purificado mediante el *kit* comercial *ExoSAP-IT PCR Clean-up* (*GE Healthcare*). Dicho *kit* comercial está basado en la actividad enzimática de la exonucleasa I y la fosfatasa alcalina (*Shrimp alkaline phosphatase*, *SAP*). La exonucleasa I degrada los *primers* sobrantes, así como el ADN de cadena simple. La fosfatasa alcalina permite la degradación de los dNTPs sobrantes. Tras el protocolo de purificación, se obtienen como productos finales el producto de PCR de cadena doble, y una mezcla de nucleótidos libres y Pi que no interfieren en la posterior reacción de secuenciación.

Tras la purificación se procedió a la cuantificación del ADN mediante la comparación en gel de agarosa con un marcador de peso molecular (*Biotools*, *1 Kb Ladder* o *100 bp Ladder*). La cuantificación mediante *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*) no se recomienda en este caso, debido a la posible sobre-estimación de la cantidad de ADN presente en la muestra.

Como alternativa, en aquellos productos de PCR que presentaron bandas secundarias no específicas, y que no pudieron ser eliminadas durante el proceso de optimización, se utilizó el *kit* comercial *illustra GFX PCR ADN and Gel Band Purification* (*GE Healthcare*).

Para ello, y tras la observación del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%, se aisló la banda principal mediante un bisturí estéril. Se añadieron 500 µl del *buffer* de extracción (ver *kit*) y se incubó a 60°C hasta la total disolución de la agarosa. Una vez disuelta, el *buffer* de extracción se incorporó al tubo superior del sistema de columnas del *kit* y se centrifugó a 12.000 rpm durante 30s. De este modo, el ADN contenido en la agarosa, atraviesa la membrana y queda retenido en ella. Tras descartar el *buffer* del tubo inferior, se añadió al tubo superior 500 µl de *buffer* de lavado (ver *kit*) y se incubó durante 30 s. A continuación se volvió a centrifugar a 12.000 rpm durante 30 s. De este modo, el *buffer* de lavado atraviesa la membrana y limpia de impurezas el ADN retenido en ella. Finalmente, se sustituye el tubo inferior por un tubo estéril y se añaden 50 µl del *buffer* de extracción al tubo superior. Tras una incubación a temperatura ambiente de 1 min, se centrifuga a 12.000 rpm durante otro min adicional. Debido a un cambio en el pH de la membrana en contacto con el último *buffer*, el ADN es liberado y puede ser recuperado en un tubo estéril colocado en este paso bajo la membrana. Tras la purificación se

procedió a la cuantificación del ADN mediante *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

La secuenciación de las muestras correspondientes a los genes estudiados fue realizada por *Stabvida*, Portugal ([www.stabvida.com](http://www.stabvida.com)). Siguiendo sus recomendaciones, se enviaron muestras de un mínimo de 15 µL con concentraciones que superaran 10 ng por cada 100 bp que tuviera la secuencia. En todos los casos se secuenciaron las dos cadenas, para confirmar cualquier cambio.

## 16 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.

Se analizaron los resultados de la amplificación específica de ambos supergrupos, estimándose las frecuencias relativas de infección en cada una de las poblaciones y años de muestreo (Anexo C). En todos los casos, se empleó la corrección de Wilson (ver Fig. 11) para estimar, tanto las frecuencias relativas (1), como la desviación estándar (2) para cada una de las frecuencias. La aplicación de dicha metodología vino determinada por la habitual infraestimación de la desviación estándar, asociada a frecuencias cercanas a 0 o 1, que se manifiesta en dichas estimas en ausencia de esta corrección (Wilson, 1927).

$$1) \quad p' = \left( p + \frac{z^2}{2n} \right) / \left( 1 + \frac{z^2}{n} \right) \quad 2) \quad s' = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n} + \frac{z^2}{4n^2}} / \left( 1 + \frac{z^2}{n} \right),$$

$$w^- = p' - z \cdot s'; \quad w^+ = p' + z \cdot s'.$$

Fig. 11: Corrección de Wilson para el valor de p, y su desviación estándar (Wilson, 1927).

En los casos en los que se disponía de muestreos seriados interanuales, se calculó la media para cada tipo de infección. El resultado fue etiquetado con el nombre de la población-media, y fue considerado para posteriores análisis como un valor representativo de esta población. Dicha media fue acompañada de su desviación típica.

Se analizaron las diferencias entre los niveles de infección dependiendo del sexo del hospedador en cada una de las poblaciones. A su vez, en el caso de los muestreos interanuales, se analizaron las diferencias entre los distintos años muestreados. Dichos análisis fueron realizados mediante test de G (a partir de las frecuencias absolutas). A su vez, se hizo un análisis de residuos tipificados con el fin de detectar aquellos datos responsables de las diferencias observadas. Estos análisis se realizaron utilizando el software *IBM SPSS 19*.

En todos los casos, se construyeron representaciones gráficas de las frecuencias de infección correspondientes a los distintos muestreos y años utilizando el software Microsoft Excel 2010. Dichas gráficas incluyen intervalos de confianza por valor de 2 veces la desviación estándar.

### **16.1 Estudio de las variaciones intra-anales.**

En el caso de la dinámica intrageneracional, se analizaron las diferencias entre las frecuencias de infección en los distintos muestreos intra-anales mediante un test de G. Se realizó un análisis de los residuos tipificados corregidos con el fin de detectar aquellos grupos que inducían las diferencias significativas (en su caso) mediante el software SPSS.

Se solicitaron las temperaturas de la estación meteorológica más próxima al Puerto de Navafría al Instituto Nacional de Meteorología (INM): Los datos facilitados pertenecen al Puerto de Navacerrada. Por otro lado, las temperaturas de Formigal, se obtuvieron del registro privado de José A. Villacampa (ARAMON S.L.) y cedidas para este estudio. Las medias de las temperaturas de los distintos meses fueron comparadas mediante una ANOVA de un factor, previa comprobación de la normalidad de los datos y la homocedasticidad de las varianzas, utilizándose el software SPSS.

## **17 MODELIZACIÓN MATEMÁTICA.**

Esta parte del estudio se realizó en colaboración con Rafael Granero-Belinchón, investigador del ICMAT (Instituto Ciencias Matemáticas, CSIC-UAM-UCM-UC3M). La metodología empleada puede consultarse en Martínez-Rodríguez *et al.* (2013a).

Con el fin de predecir la evolución de las frecuencias de infección a largo plazo (4.000 generaciones), se desarrolló una modificación del modelo propuesto por Turelli (Turelli, 1994), re-escrito en forma matricial, tal y como proponían Vautrin *et al.* (2007). Este número de generaciones fue seleccionado debido a los datos previos (Vautrin *et al.*, 2007), que indicaban que era suficiente para alcanzar el estado estacionario. Este modelo tiene como característica principal el considerar dos cepas independientes, cuyas frecuencias de infección están determinadas por los parámetros F (fertilidad relativa de los individuos infectados frente a los no infectados),  $\mu$  (tasa de transmisión de la bacteria de las hembras a su descendencia) y H (nivel de incompatibilidad citoplasmática que afecta a los cruzamientos incompatibles). Se puede consultar una descripción detallada de los distintos parámetros en la Tabla 3. En el trabajo de





Vautrin *et al.* (2007) puede consultarse una versión simplificada del modelo, en el que solo se considera una cepa, así como los datos adicionales sobre la modelización.

Parámetro	Significado
$x=F$	Individuos infectados por el supergrupo F
$x=B$	Individuos infectados por el supergrupo B
$x=FB$	Individuos coinfectados
$x=\emptyset$	Individuos no infectados
$F_x$	Fecundidad de las hembras infectadas por la cepa X, en relación a la fertilidad de las hembras no infectadas
$(1-F_x)$	“Coste” de la infección por la cepa X
$(1-F_x)=0$	La infección por X no supone un “coste” para el individuo infectado.
$\mu_x$	Proporción de huevos no infectados procedentes de una hembra infectada por la cepa X
$(1-\mu_x)$	Tasa de transmisión de la cepa X
$(1-\mu_x)=1$	Transmisión perfecta de madres a descendientes
$H_x$	Proporción de huevos viables en un cruzamiento potencialmente incompatible afectado por la cepa X.
$(1-H_x)$	Nivel de incompatibilidad citoplasmática
$(1-H_x)=1$	Incompatibilidad citoplasmática total
$H_{UNI}$	Proporción de huevos viables en un cruzamiento afectado por incompatibilidad citoplasmática unidireccional
$H_{BI}$	Proporción de huevos viables en un cruzamiento afectado por incompatibilidad citoplasmática bidireccional
$\rho = -1$	Parámetro de corrección. El valor de -1 se corresponde a organismos diploides.

Tabla 3: Significado de los distintos parámetros utilizados en la modelización.

Las frecuencias iniciales de *Wolbachia* están representadas en un vector  $P_t$

$$P_t = [P_{f,0}, P_{f,F}, P_{f,B}, P_{f,FB}, P_{m,0}, P_{m,F}, P_{m,B}, P_{m,FB}] \quad (1)$$

donde  $P_{f,0}$  representa las frecuencias de infección del supergrupo F, B, FB o 0, estimadas en un determinado sexo (f=hembra; m=macho).

Al considerarse únicamente transmisión vertical, esto es de las hembras a su descendencia, y considerándose una única población con cruzamientos aleatorios, las frecuencias de la infección en la generación  $t+1$  dependerán del efecto materno, expresado en la matriz  $M_{ct}$  y el efecto paterno, expresado por la matriz  $M_{ci}$ . El factor  $W_t$  servirá para normalizar las frecuencias.



El modelo queda formalizado como:

$$P_{t+1} = (M_{ct}P_t) \circ (M_{ci}P_t) \circ W_t \quad (2)$$

Donde " $\circ$ " denota el producto de Hadamard entre las dos matrices. Dicho producto consiste en una multiplicación directa entre los elementos de la matriz. Las matrices  $M_{ct}$  y  $M_{ci}$  serán:

$$M_{ct} = \begin{bmatrix} M_f & 0 \\ M_f & 0 \end{bmatrix} \quad (3)$$

y

$$M_{ci} = \begin{bmatrix} 0 & M_{mf} \\ 0 & M_{mm} \end{bmatrix} \quad (4)$$

donde

$$M_f = \begin{bmatrix} 1 & F_F \mu_F & F_B \mu_B & F_F F_B \mu_F \\ 0 & F_F (1 - \mu_F) & 0 & F_F F_B (1 - \mu_F) \mu_B \\ 0 & 0 & F_B (1 - \mu_B) & F_F F_B \mu_F (1 - \mu_B) \\ 0 & 0 & 0 & F_F F_B (1 - \mu_F) (1 - \mu_B) \end{bmatrix} \quad (5)$$

$$y \quad M_{mf} = \begin{bmatrix} 1 & H_F & H_B & H_{FB} \\ 1 & 1 & H_B & H_B \\ 1 & H_F & 1 & H_F \\ 1 & 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (6)$$

siendo  $\rho = -1$  y  $M_{mf} = M_{mm}$ .

A partir de este modelo, se modificó la matriz  $M_{ci}$  (ver

Fig. 12) con el fin de adaptarlo a las características de la infección de *Wolbachia* en *C. parallelus*. Tales modificaciones afectaron a varias asunciones del modelo matricial propuesto por Vautrin *et al.*, (2007), que asumía la independencia de las dos cepas de *Wolbachia* involucradas.

Según el modelo propuesto por estos autores, ambas cepas de *Wolbachia* coexisten pero no interaccionan, de modo que el nivel de incompatibilidad en un cruce entre un macho



coinfectado por ambas cepas y una hembra no infectada sería  $H_{FB} = H_F * H_B$ . Sin embargo, si consideramos que puede existir interacción entre cepas, esta asunción debe contemplarse con cautela.

Los cruzamientos experimentales realizados por Mario Zabal-Aguirre, en el marco de su tesis doctoral, permitieron la estima de los niveles de incompatibilidad citoplasmática producida por *Wolbachia* en este hospedador (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que el nivel de incompatibilidad expresada en cruzamientos entre machos coinfectados y hembras no infectadas no puede considerarse como el producto de las incompatibilidades individuales entre cepas:  $H_{FB} \neq H_F * H_B$ . A su vez estos estudios estimaron valores distintos entre aquellos cruzamientos afectados por incompatibilidad unidireccional y bidireccional. Debido a ello, modificamos el modelo para adaptarlo a los valores de H estimados de forma experimental en *C. parallelus*.

Por otra parte, nuestro modelo permite realizar distintas simulaciones en función del tipo de diploidía del hospedador. En este caso, al ser *C. parallelus* un organismo diploide, se fijó el parámetro  $\rho = -1$ . Tanto las tasas de transmisión como la fecundidad se consideraron independientes, dado que no existen datos que indiquen lo contrario:  $\mu_{FB} = \mu_F * \mu_B$  y  $F_{FB} = F_F * F_B$ .

### **17.1 Evolución de las frecuencias de infección considerando una única cepa.**

Se exploró la región de mantenimiento de la infección en una hipotética especie diploide infectada por una única cepa de *Wolbachia*. Esta situación puede observarse en algunas poblaciones de *C. parallelus*, donde solo existe infección por una cepa, por ejemplo Bubión (Granada, España) o Mokronog (Eslovenia). Para ello, se consideró que  $F=1$ , y el nivel de incompatibilidad  $H_{UNI}=0.67$  (Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre, com. pers.).

### **17.2 Evolución de las frecuencias de infección considerando dos cepas.**

En este apartado se desarrollaron dos modelos, con el fin de estudiar la evolución de las frecuencias de *Wolbachia* coinfectando a *C. parallelus*: “Modelo restrictivo” y “Modelo relajado” (Fig. 12).

Con el fin de integrar los resultados obtenidos en el estudio de la dinámica intrageneracional de la infección, se incorporó la reducción en las frecuencias de infección observadas experimentalmente en ambos modelos. De este modo se pretendía predecir el



efecto que esta variación intrageneracional podía tener a largo plazo en la evolución de las frecuencias de infección.

Todas las simulaciones se llevaron a cabo fijando  $F_1=F_2=1$ , basándonos en los datos experimentales obtenidos a partir de los cruzamientos dirigidos (Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre, com. pers.). Debido a la complejidad del modelo y el gran número de parámetros estimados, se calcularon las frecuencias resultantes tras 4.000 generaciones (equilibrio estable) para un rango restringido de valores para la tasa de transmisión. Se realizaron simulaciones para un rango de  $\mu=\mu_1=\mu_2=0,1$ ;  $\mu=\mu_1=\mu_2=0$ , de acuerdo con los valores experimentales obtenidos en multitud de especies (Turelli & Hoffmann, 1995). Por otro lado, el rango de valores para la incompatibilidad citoplasmática fue  $H=0$  a  $H=1$ .

		Tipo de infección en machos			
		∅	1	2	12
a)	∅	C	H <sub>F</sub>	H <sub>B</sub>	H <sub>FB</sub>
	1	C	C	H <sub>B</sub>	H <sub>B</sub>
	2	C	H <sub>F</sub>	C	H <sub>F</sub>
	12	C	C	C	C
b)	∅	C	H <sub>UNI</sub>	H <sub>UNI</sub>	H <sub>UNI</sub>
	1	C	C	H <sub>UNI</sub>	H <sub>UNI</sub>
	2	C	H <sub>UNI</sub>	C	H <sub>UNI</sub>
	12	C	C	C	C
c)	∅	C	H <sub>UNI</sub>	H <sub>UNI</sub>	H <sub>UNI</sub>
	1	C	C	H <sub>BI</sub>	H <sub>BI</sub>
	2	C	H <sub>BI</sub>	C	H <sub>BI</sub>
	12	C	C	C	C

Fig. 12: Modificaciones realizadas sobre la matriz  $M_{ci}$  (Vautrin *et al.*, 2007). “C” representa los cruzamientos compatibles. “ $H_{UNI}$ ” representa la proporción de huevos viables en un cruzamiento afectado por incompatibilidad unidireccional. “ $H_{BI}$ ” representa la proporción de huevos viables en un cruzamiento afectado por incompatibilidad uni y bidireccional.  $\emptyset$  representa individuos no infectados, 1 y 2 representan a los individuos infectados por las cepas 1 y 2 respectivamente, y 12 representa a los individuos coinfectados. a) Matriz original, b) Matriz considerando únicamente  $H_{UNI}$ , c) Matriz considerando  $H_{UNI}$  y  $H_{BI}$ , según la propuesta de Zabal-Aguirre, com. pers. y Bella *et al.* (2010).

### 17.2.1 Modelo restrictivo.

Este primer modelo es una versión simplificada en la que se asume que los niveles de incompatibilidad citoplasmática son  $H_{UNI}=H_F=H_B=H_{FB}$ . No se considera independencia, por lo que  $H_{FB} \neq H_F * H_B$ , y asume que no existe un rescate parcial entre cepas, esto es, que la incompatibilidad entre un macho coinfectado y una hembra infectada por la cepa F, es la misma que la incompatibilidad entre este mismo macho coinfectado y una hembra no infectada.

La matriz  $M_{mf}$  sería:

$$M_{mf}^1 = \begin{bmatrix} 1 & H_{UNI} & H_{UNI} & H_{UNI} \\ 1 & 1 & H_{UNI} & H_{UNI} \\ 1 & H_{UNI} & 1 & H_{UNI} \\ 1 & 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (7)$$

Se debe tener en cuenta que la matriz  $M_{ct}$  no se ve modificada respecto al modelo original propuesto por Vautrin *et al.* (2007). Debido a que no disponemos de información sobre en qué modo la interacción entre cepas afecta a sus tasas de transmisión y a la fecundidad de los individuos infectados, consideraremos el modelo más simple, en el cual se sume que ambas cepas son independientes.

### 17.2.2 Modelo relajado.

Los datos experimentales obtenidos a partir de los cruzamientos dirigidos llevados a cabo entre individuos de *C. parallelus* sugieren que puede existir un rescate parcial entre cepas. Esto se ve reflejado en que la incompatibilidad detectada en cruzamientos entre machos coinfectados y hembras no infectadas, es mayor que en los cruzamientos entre machos coinfectados y hembras infectadas por una única cepa (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010).

Este modelo relajado no considera independencia,  $H_{FB} \neq H_F * H_B$ , y asume que  $H_{UNI}=H_F=H_B$ , donde  $H_{UNI}$  es el nivel de incompatibilidad en cruzamientos afectados por incompatibilidad unidireccional entre machos coinfectado o infectados por una única cepa y hembras no infectadas. Los cruzamientos experimentales en los que se vean involucradas distintas cepas se verán afectados por  $H_{BI}$  (Fig. 12)

Para simplificar los cálculos, se fijó  $H_{BI}=0,83$  basándonos en las estimas experimentales disponibles para *C. parallelus* (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010) Este valor permite

simular un rescate parcial entre cepas, tal y como propone el modelo. Por su lado, se computaron rangos de  $H_{UNI}$  de 0 a 1.

Así, la matriz  $M_{ci}$  se escribió en términos de:

$$M_{mf}^2 = \begin{bmatrix} 1 & H_{UNI} & H_{UNI} & H_{UNI} \\ 1 & 1 & H_{BI} & H_{BI} \\ 1 & H_{BI} & 1 & H_{BI} \\ 1 & 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (8)$$

### 17.3 Evolución de frecuencias con variación intra-generacional.

Tal y como se estableció en los objetivos del trabajo, estamos interesados en establecer cómo la variación intrageneracional detectada en algunas poblaciones de *C. parallelus* puede afectar a la evolución de las frecuencias de infección a largo plazo. Para ello, se implementó esta variación en los dos modelos anteriormente descritos. Para ello se dividió cada generación en tres periodos, correspondientes a los tres puntos de muestreo, y se asumió que las frecuencias de muestreo evolucionaron de acuerdo con la ecuación 9:

$$P'_{0,t} = (M_{ct}P_{0,t})^\circ (M_{ci}P_{0,t})^\circ W_t \quad (9)$$

Las frecuencias correspondientes al mes de julio, serán equivalentes a las frecuencias iniciales de la población en la generación t. Sin embargo, debido a la disminución progresiva de las frecuencias detectadas experimentalmente (ver apartado “Variación intra-generacional de la infección por *Wolbachia*”, pág. 128), las frecuencias de infección por *Wolbachia* de los individuos que se reproduzcan en agosto ( $P_{0,1}$  = frecuencias de agosto) serán el resultado de la disminución de las frecuencias de infección respecto a julio. Y a su vez, siendo las frecuencias de infección por *Wolbachia* de los individuos que se reproduzcan en septiembre ( $P_{0,2}$ =frecuencias de septiembre), serán el resultado de la disminución de las frecuencias de infección respecto a agosto.

La variación de las frecuencias intrageneracional se incorporó a ambos modelos a través de una regla Maltusiana para las frecuencias:

$$P_{i+1,t} = A_i * P_{i,t} \quad (10)$$

$$\text{donde } A_i = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 - a_i \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & a_i \end{bmatrix} \quad (11)$$

Las tasas de cambio  $a_0$  y  $a_1$  se ajustaron a los valores experimentales observados en la población de Navafría durante los muestreos de 2005.

Así pues el modelo establece que los individuos se reproducen inicialmente en julio, y ponen los huevos, de modo que estas primeras puestas se verán afectadas por las frecuencias de infección en ese momento, así como los potenciales cruzamientos incompatibles que se establezcan. A su vez, esto mismo ocurrirá en agosto y en septiembre, cuyas frecuencias de infección serán distintas que las del mes de julio, y por tanto también los potenciales cruzamientos incompatibles.

Las frecuencias correspondientes a la siguiente generación serán el resultado de la reproducción de los individuos reproducidos en julio, agosto y septiembre (Fig. 13), tal que:

$$P_{0,t+1} = \frac{1}{3} \sum_{i=0}^2 P'_{i,t} \quad (12)$$

Las simulaciones se llevaron a cabo usando el software *MATLAB* (2010; The MathWorks, Natick, MA, USA) y se obtuvieron las frecuencias tras 4.000 generaciones, para asegurarnos que se alcanzaba un equilibrio estable.

## **18 CLASIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES ACORDE CON SUS FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.**

Los análisis efectuados a continuación incluyen, además de las poblaciones caracterizadas en este trabajo, poblaciones previamente descritas correspondientes a los muestreos realizados a lo largo de los años 2002 a 2006 (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Sin embargo, debido al cambio en la metodología empleado para la detección de la bacteria

(cambio en los *primers* empleados, e inclusión de una PCR-*nested* para mejorar la detección) se excluyeron del análisis parte de las poblaciones correspondientes a los años 2002, 2003 y 2004. Así mismo, se excluyeron del análisis aquellas poblaciones que presentaron desviaciones significativas relacionadas con un tamaño muestral reducidos. La lista detallada de poblaciones y años puede consultarse en la Tabla C1 del anexo C.

También se incluyeron en los análisis ciertas poblaciones de la zona híbrida, concretamente las poblaciones de Gabas, Sallent de Gállego y Escarrilla del año 2009, así como la población de Capileira y parte de la población de Portalet del año 2009, caracterizadas por el Dr. J. Sarasa en el marco de su Tesis Doctoral. El resto de poblaciones se caracterizaron con la ayuda de Francisca Arroyo-Yebras, técnico de laboratorio asociado a los proyectos de investigación CGL2002-00232/BOS, CGL2005-02898/BOS y CGL2009-08380/BOS.

Se realizó una clasificación jerárquica de conglomerados, de las distintas poblaciones analizadas. Dicho análisis se realizó en función de las frecuencias de infección de cada uno de los supergrupos de *Wolbachia*, así como de sus niveles de coinfección. Para ello, se utilizaron las distancias euclídeas al cuadrado calculadas entre los valores de las frecuencias relativas de cada una de las poblaciones. A continuación se construyó un dendograma, utilizando para ello varias metodologías (vecino más próximo, vecino más lejano...) cuyos resultados fueron equivalentes (ver más adelante). Dichos análisis se realizaron utilizando el software *IBM SPSS 19*.

La representación gráfica permitió establecer varios grupos *a priori*, que posteriormente serían testados estadísticamente, siguiendo la metodología propuesta por (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Para ello se utilizaron las propiedades aditivas del test de G (Sokal & Rohlf, 2012), calculándose los valores de  $G_{\text{pooled}}$  (entre los grupos),  $G_{\text{heterogeneity}}$  (dentro de los grupos) y  $G_{\text{total}}$  (de forma global) expresadas como razones de verosimilitud en los resultados obtenidos de las tablas de contingencia. Esta aproximación nos permitió estimar qué porcentaje del valor de  $G_{\text{total}}$  estimado se debe al valor de G entre grupos:  $G_{\text{pooled}}/G_{\text{total}}$  para los distintos valores de  $K=2,3,4,5,6$ .

A su vez, se empleó el test de *Kruskal-Wallis*, prueba no paramétrica, para comparar las frecuencias de infección entre los patrones resueltos mediante el análisis jerárquico (software *IBM SPSS 19*).





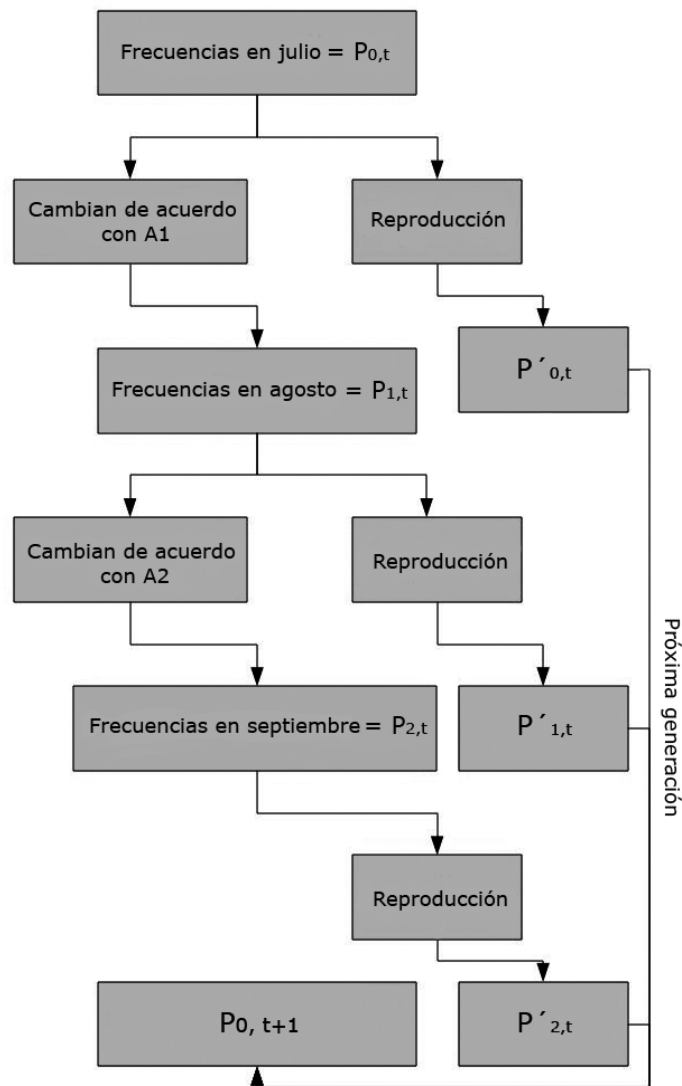


Fig. 13: Esquema que representa el cambio de las frecuencias dentro de la misma generación, y en generaciones sucesivas.

Por otro lado, se realizó una variante del test de *AMOVA* (*Analysis of MOlecular VAriance framework*), atendiendo a las frecuencias de infección. Para ello se caracterizaron en cada población 4 grupos, correspondientes al número de individuos infectados por F, B, coinfectados y no infectados y se computó la red de mínima diferenciación entre grupos ("*Minimum Spanning Network*": aquel árbol sin raíz que conecta todos los vértices y minimiza los pesos asignados a cada distancia). La adaptación de esta metodología permite estimar la diversidad de la estructura genética usando para ello las frecuencias de los distintos grupos considerados (sin contemplar en este caso, la distancia genética entre grupos, sólo sus

frecuencias) (Excoffier *et al.*, 1992). En este caso, los muestreos interanuales de una misma población se agruparon, considerándose como un único muestreo. Las distancias entre poblaciones se computaron como la distancia euclídea cuadrada (al igual que se había realizado previamente en el caso de la construcción del dendograma). La significación de los componentes de la covarianza asociados a los distintos niveles de diferenciación (entre individuos, entre poblaciones, dentro del grupo de poblaciones y entre grupos), se testaron usando el procedimiento de permutaciones no paramétricas propuesto por Excoffier *et al.* (1992), y que consiste en la reorganización al azar de las distintas poblaciones en los distintos grupos propuestos y su evaluación estadística. Se testaron varias hipótesis, correspondientes al número de grupos considerados (K), y las poblaciones adscritas a dichos grupos. Dicho análisis fue realizado mediante el Software *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005). Se recomienda consultar el manual del software para los detalles de la metodología empleada (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/arlequin31.pdf>).

Por otro lado, se analizó la diferenciación de las poblaciones en función de la distancia geográfica, utilizando el Test de Mantel. Éste analiza la significación estadística de la correlación existente entre varias matrices, por ejemplo una matriz que refleje distancia genética, y otra matriz que recoja la distancia geográfica entre las poblaciones. En este caso se analizó la significación en la correlación entre la matriz de distancias euclídeas al cuadrado entre las frecuencias de los distintas categoría de infección, y la matriz correspondiente a la distancia en línea recta entre las distintas poblaciones. Esta última matriz fue generada mediante el software *Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3* utilizando las coordenadas geográficas de cada una de las poblaciones ([http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg/](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/)).

El test de Mantel fue realizado mediante el Software *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005). En el manual del software pueden consultarse los detalles de la metodología empleada. (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/arlequin31.pdf>).

## **19 ANÁLISIS FILOGENÉTICO I.**

### **19.1 Muestreo genético.**

Las secuencias de distintas cepas del género *Wolbachia* seleccionadas para este estudio (Anexo E) fueron elegidas teniendo en cuenta las ya disponibles en las bases de datos y cuáles

eran necesarias para completar la representación homogénea de las distintas cepas bacterianas de este género.

La búsqueda se centró tanto en las secuencias correspondientes al gen *16S rRNA*, como en los *loci* analizados para el MLST propuesto para el género *Wolbachia*.

En el caso de los genes analizados para el MLST, se construyó un alineamiento que incluía los distintos alelos descritos para cada gen hasta la fecha. Esto supuso la inclusión de un elevado número de OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas: en nuestro caso las secuencias de los genes descritos para las distintas cepas descritas), que dificultó el análisis en algunas ocasiones. Concretamente, en el caso del gen *fbpA*, y debido a las limitaciones computacionales, se redujo el número de OTUs analizadas. Para ello, se seleccionaron únicamente aquellas secuencias plenamente caracterizadas, excluyéndose aquellas cuyo hospedador no aparecía en las bases de datos. Esto permitió reducir significativamente el número de OTUs analizadas y facilitó la computación de los distintos análisis.

En el caso del análisis de los 5 genes del MLST concatenados, se construyó un alineamiento incluyéndose los distintos haplotipos o ST descritos para las cepas de este género bacteriano, así como aquellas que infectan a *C. parallelus*. Estas últimas nombradas como Cp\_ST(Número). Este alineamiento se construyó seleccionándose únicamente aquellas ST en las que se hubiera descrito su hospedador. El motivo de esta decisión fue estrictamente operativo, debido a que la inclusión de un número demasiado alto de OTUs en el análisis del alineamiento correspondiente a los genes concatenados, suponía graves problemas de computación. La concatenación de los genes se realizó mediante las herramientas y bases de datos disponibles en la web del MLST de *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/Wolbachia/>)

En la actualidad no existen secuencias publicadas en las bases de datos, correspondientes a los genes analizados mediante el MLST para los supergrupos C, G, H, I, J y K, por lo que el análisis sólo permite una reconstrucción parcial de la filogenia de la bacteria, limitándonos a los supergrupos A, B, D, E y F. Señalar que hasta donde nosotros sabemos, los supergrupos C, G, H, I, J y K no han sido caracterizados hasta la fecha en ortópteros.

Las nuevas secuencias obtenidas en este estudio fueron comparadas con las homólogas del género depositadas en *Genbank* (Benson *et al.*, 2008) y la bases de datos MLST para el género *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/Wolbachia>) (Baldo *et al.*, 2006b). Las secuencias se denominarán con el nombre científico de la especie hospedadora en la que fueron identificadas, o bien, en su caso, mediante la asignación de su correspondiente número alélico siguiendo la nomenclatura del MLST (Baldo *et al.*, 2006b).

Para el análisis filogenético y clasificación de las distintas cepas de *Wolbachia* detectadas en *C. parallelus* se amplificaron y secuenciaron los genes *16S rRNA*, *coxA*, *fbpA*, *hcpA*, *ftsZ* y *gatB* en un total de 127 individuos (Anexo D) de distintas poblaciones. Se caracterizaron totalmente (esto es, pudieron ser caracterizados todos sus *loci*) 110 individuos. El resto de ellos fueron caracterizados de forma incompleta, debido al fallo reiterado de la amplificación o de la secuenciación de alguno de los *loci*. En 83 de ellos, fue amplificado adicionalmente el gen *wsp*, incluyendo 6 individuos procedentes de las poblaciones noruegas no contados anteriormente.

Los amplificados fueron secuenciados en ambos sentidos, utilizando los *primers forward* y *reverse* indicados. Posteriormente, los cromatogramas fueron revisados a mano, utilizando el software *DNASTAR Lasergene Core Suite* (<http://www.dnastar.com/t-products-lasergene.aspx>). Aquellos casos esporádicos en los que los cromatogramas presentaron doble señales (como consecuencia quizás de dobles infecciones no detectadas mediante la metodología convencional, o de contaminaciones experimentales durante su posterior manipulación), las secuencias fueron desechadas.

Para verificar que las secuencias obtenidas para los distintos *loci* correspondientes al MLST cumplieran con los requisitos planteados en la descripción del procedimiento de selección de *loci* en un sistema MLST, para cada *locus* se analizó entre otros parámetros el número de haplotipos, el contenido en G+C, el nivel de diversidad nucleotídica por sitio ( $P_i$ ) y  $K_s/K_a$  mediante el software *DnaSP* (Rozas, 2008). Para consultar el significado de los distintos parámetros consultar ver Tabla B2, en el anexo B.

Tras el análisis filogenético, se estimaron estos mismos parámetros, distinguiendo entre los alelos asociados al supergrupo F y al supergrupo B. Así mismo, se realizaron estos análisis considerando el alineamiento resultante de la concatenación de los 5 *loci*, tanto de forma global, como distinguiendo entre cepas F y B. En el caso de la secuencia resultante de la concatenación de los 5 *loci*, los marcos de lectura se asignaron de forma individual para cada gen.

## 19.2 Análisis de secuencias y alineamiento múltiple.

El alineamiento de secuencias es un paso crítico en la construcción de nuestro árbol filogenético. Este alineamiento constituye nuestra hipótesis de partida sobre la homología de cada uno de los residuos de nuestras secuencias biológicas (tanto nucleótidos, como aminoácidos). Esto es, asumimos que cada residuo ha divergido a partir de un antecesor común. Para su obtención debemos recurrir a algoritmos computacionales, en este caso, implementados

en los distintos software disponibles. Uno de los más comúnmente usados es el algoritmo implementado en la familia de programas *Clustal* (Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007).

En este caso, el alineamiento múltiple de cada gen se realizó utilizando el software *Clustal X* (Larkin *et al.*, 2007). Este algoritmo permite realizar alineamientos múltiples en tres etapas: En primer lugar todas las secuencias son comparadas a pares. A continuación se construye un dendograma sin raíz mediante *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987), utilizando la similitud entre las secuencias como criterio y finalmente, se construye el alineamiento utilizando este dendograma como árbol guía.

La calidad del alineamiento fue comprobada manualmente mediante los valores de soportes facilitados por el propio software, gracias a su interfaz gráfica. En todos los casos, los alineamientos se consideraron adecuados para la posterior inferencia filogenética.

Los alineamientos resultantes se editaron. Para ello se utilizó el software *Gblocks 0.19b*, utilizando los parámetros por defecto (Castresana, 2000). Este software permite la localización y eliminación de los *gaps* o *huecos*, así como de las posiciones que resultaron ambiguas, y que pudieran añadir ruido al posterior análisis.

Para evitar los efectos que sobre la topología de los árboles puedan tener la diferencia en la tasa de sustitución entre taxones, fenómeno denominado “*atracción de ramas largas*”, se estimaron las tasas evolutivas para cada posición del alineamiento mediante máxima verosimilitud utilizándose el módulo *basemL* del software *PAML* (Yang, 2007).

Este software permitió asignar cada posición del alineamiento a una de las 5 categorías discretas para la distribución gamma. En el caso de que aparecieran, se eliminaron manualmente aquellas posiciones pertenecientes a la última categoría, con tasas superiores a 4,76 remplazamientos por sitio. Las posiciones de los distintos genes analizados en la aproximación multi-locus no superaron las 0,30 sustituciones por sitio, por lo que no fue necesario descartar ninguna posición.

### 19.3 Análisis de saturación.

Uno de los requisitos para asegurar que los posteriores análisis filogenéticos sean adecuados, es que las secuencias empleadas para la reconstrucción filogenética no se encuentren saturadas. Esto es, que la existencia de cambios múltiples en una determinada posición no diluya la información filogenética existente en las secuencias empleadas.

Como consecuencia de la saturación, la similitud entre dos secuencias sería fruto del azar y no de su homología, por lo que la información filogenética se perdería,



independientemente del método empleado para su reconstrucción. De ahí la importancia de analizar si una determinada secuencia está o no saturada antes de continuar con nuestros análisis. Para realizar este análisis se han utilizado los test de Xia y colaboradores (Xia, 2001; Xia *et al.*, 2003), implementados en el software *DAMBE* (Xia & Z., 2001; Xia & Lemey *et al.*, 2009).

A su vez, este software permite la visualización de este fenómeno mediante la representación gráfica del número esperado de transiciones y transversiones frente a las distancias genéticas corregidas. Los datos empíricos soportan que las transiciones sean más frecuentes que las transversiones. Debido a ello, esperaríamos que las transiciones y las transversiones se incrementaran de forma lineal en función del aumento de la distancia genética corregida, siendo las transiciones más frecuentes que las transversiones. Sin embargo, debido al fenómeno de la saturación, ocasionalmente podemos observar que el número esperado de transversiones es mayor que el de transiciones: esto puede ser indicativo de saturación.

#### **19.4 Selección del modelo evolutivo.**

La estimación del modelo de sustitución nucleotídica (o modelo de evolución) apropiado es un paso previo esencial en el análisis filogenético. La asunción de un modelo de evolución incorrecto supone que todos los parámetros estimados, esto es, longitud de ramas, las tasas de transiciones y transversiones, así como la tasa de divergencia entre otros, pueden ser sobrestimados (Posada, 2009). Generalmente, su estimación suele realizarse utilizando criterios de máxima verosimilitud, buscando el modelo que optimiza la probabilidad de obtener nuestros datos. La selección del modelo adecuado es esencial para garantizar la calidad de nuestro análisis (Posada & Crandall, 2001c; Bos & Posada, 2005; Luo *et al.*, 2010).

Una aproximación intuitiva al problema de seleccionar el modelo que mejor explica nuestros datos, sería considerar el modelo más complejo (esto es, que incorpore más parámetros). Sin embargo, si bien incrementar el número de parámetros de nuestro modelo hace que éste se aproxime más a la realidad analizada, también supone varios problemas. En primer lugar, el notable incremento de la complejidad computacional de estimar cada uno de esos parámetros, y en segundo lugar, el incremento progresivo de la varianza global del modelo, lo que implica una mayor varianza en las estimas realizadas. Por lo tanto, debemos seleccionar aquel modelo que adaptándose a nuestros datos, no sea tan complejo, como para suponer un problema de computación excesivo, o incrementar en exceso la varianza de las estimas (Posada, 2009).

Existen varios criterios estadísticos que permiten comparar entre distintos modelos. En primer lugar, estos test valoran la idoneidad de un determinado modelo a nuestros datos, utilizando una aproximación de máxima verosimilitud. Posteriormente, será necesario comparar entre varios modelos posibles. Es común el empleo del test *likelihood ratio test* (LRT) (Posada & Crandall, 2001a), si bien, existen otros test sin sus limitaciones, por lo que se ha desestimado su utilización. En su lugar, se han empleado metodologías tales como el *Akaike Information Criterion* (AIC) (Akaike, 1973; Akaike, 1974) o el *Schwarz Criterion* (SC; también conocido como *Bayesian Information Criterion*, o BIC) (Schwarz, 1978) que se emplean para ordenar en un listado los distintos modelos comparados, estimando el soporte para cada uno de ellos y ordenándolos en consonancia. Estas técnicas utilizan la verosimilitud de cada modelo como una medida de su idoneidad a los datos, penalizando a los modelos de mayor complejidad (Johnson & Omland, 2004).

La estimación del modelo de evolución de sustitución nucleotídica más adecuado en cada gen se realizó mediante el paquete informático *jModeltest* (Posada, 2008) con el criterio de información *Akaike* (AIC). Como hemos comentado, este criterio intenta describir un equilibrio entre el error cometido cuando elegimos un determinado modelo, y el incremento de la varianza asociado al incremento de los parámetros estimados en modelos más complejos (Akaike, 1973; Akaike, 1974).

De este modo, el modelo de sustitución nucleotídica “*General Time Reversible*” (GTR) no asume igualdad en las frecuencias de bases nucleotídicas, considerando distintas probabilidades para cada cambio de una base por otra. Sin embargo, el modelo de sustitución nucleotídica de “*Hasegawa-Kishino-Yano*” (HKY) tampoco asume igualdad en las frecuencias de bases nucleotídicas, pero tiene en cuenta la distinta probabilidad de ocurrencia entre transiciones y transversiones (modificado de Kimura -2 parámetros).

Para la selección del modelo evolutivo se tuvo en cuenta el mejor modelo propuesto por el software *jModeltest*, según el criterio AIC, pero considerando las limitaciones en la implementación de los distintos modelos en los software de análisis filogenético (*MrBayes* y *RaxML*) que se iban a emplear a continuación. De este modo, si el modelo seleccionado en primer lugar no puede ser implementado en el software de análisis, se seleccionará el mejor modelo (según ese criterio), que sí que pueda ser implementado. En el caso del gen *ftsZ*, se seleccionó el modelo *GTR+G+I*, y el modelo *GTR+G* en el caso de los genes *coxA*, *gatB*, *fbpA* y *hcpA*. En los genes concatenados se asignaron los modelos evolutivos descritos para cada gen a cada una de las particiones. La corrección mediante *Gblock* del alineamiento no modificó dichos

modelos. En el caso del gen *16S rRNA*, el modelo seleccionado fue *HKY+G+I*. En el caso del gen *wsp* el modelo seleccionado tras la corrección mediante *Gblock* fue el *GTR+G*.

## 20 ANÁLISIS FILOGENÉTICO II: INFERENCIA FILOGENÉTICA.

### 20.1 Genes *16S rRNA*, *loci* descritos en el MLST y gen *wsp*.

En este caso, los análisis filogenéticos se realizaron en base a las secuencias nucleotídicas de tres conjuntos de datos distintos, correspondientes al gen *16S rRNA*, a la concatenación de los *loci* implicados en el análisis mediante MLST de las distintas cepas: *gatB*, *coxA*, *fbpA*, *ftsZ* y *gatB*, así como al gen *wsp*. De igual modo, se infirió la topología de los árboles correspondientes a cada uno de estos *loci* por separado.

El grupo externo para enraizar el árbol fue, en el caso del gen *16S rRNA*, el taxón *Rickettsia* sp. perteneciente al orden Rickettsiales, que también incluye a *Wolbachia* sp. En el caso de los *loci* empleados para caracterizar las cepas en función al MLST, así como el gen *wsp*, no se incluyó ningún grupo externo, al no estar disponibles en las bases de datos las secuencias correspondientes a estos genes en organismos que pudieran considerarse como *outgroup*.

La visualización y posterior edición de los árboles filogenéticos se ha realizado mediante el software *Figtree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). La conversión entre distintos formatos en los archivos de datos fue realizado mediante la herramienta on-line *ALTER* (Glez-Pena *et al.*, 2010). Así mismo, para distintos análisis la edición manual de los archivos de texto fue realizada mediante *Notepad ++* (<http://notepad-plus-plus.org/>).

### 20.2 Máxima Verosimilitud.

La reconstrucción filogenética basada en máxima verosimilitud tiene como objetivo la búsqueda del árbol más verosímil, siendo la verosimilitud la probabilidad de los datos (nuestro alineamiento) dado un árbol (topología del árbol, longitud de las ramas, tasas de sustitución...), y un modelo evolutivo (Schmidt & von Haeseler, 2009; Vargas & Zardoya, 2012).

En nuestro caso, la filogenia del género *Wolbachia* fue estimada por Máxima Verosimilitud (ML) (Felsenstein, 1981) mediante el software *RAxML versión 7.0.4 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood)* (Stamatakis, 2006a) mediante el algoritmo *rapid hill-climbing* (Stamatakis *et al.*, 2007). Este software está basado en el módulo *fastDNAmL*, a su vez inspirado en el modulo *dnaml* del paquete *PHYLIP* (Felsenstein, 1989).



Se seleccionó este paquete informático debido a que su algoritmo de búsqueda, una variante del algoritmo *SPR* (Hordijk & Gascuel, 2005), se caracteriza por ser relativamente rápido: una característica importante debido al alto número de OTUs analizadas. Se computaron 100 árboles de ML, a partir de 100 árboles aleatorios obtenidos por máxima parsimonia. Los modelos evolutivos implementados en dicho software son limitados, por lo que en este caso, se aplicó el modelo *GTR+G+I* en todos los genes.

El análisis de ML únicamente nos muestra una estima de la filogenia de nuestros clados, si bien, no nos indica el soporte estadístico de dichos clados. Es por ello que se han desarrollado varios test que nos permiten evaluar la confianza que podemos depositar en el árbol obtenido. En este caso, el soporte de las ramas internas fue evaluado por *bootstrapping* (Felsenstein, 1985), computándose 1000 réplicas. Esta metodología está basada en el remuestreo a partir del propio alineamiento, seleccionándose de forma aleatoria *n* columnas (siendo *n* el número de posiciones del alineamiento), independientemente que ello suponga repetir varias de ellas. Cada uno de estos “nuevos” alineamientos serán nuevamente evaluados, de modo que podamos comprobar la repetitividad de la topología del árbol, expresada como el porcentaje de árboles que respaldan la topología inferida. Valores inferiores al 70% deberán tomarse con precaución (Pattengale *et al.*, 2010).

### 20.3 Inferencia Bayesiana

Paralelamente, el análisis filogenético de las cepas caracterizadas mediante los diferentes sistemas de clasificación, así como los distintos *loci* de forma individual, se realizó mediante Inferencia Bayesiana. Esta aproximación, al contrario de una aproximación probabilística clásica, busca obtener el árbol que tiene la mayor probabilidad a posteriori, que es la probabilidad de un árbol, dado un modelo de evolución y los datos (Vargas & Zardoya, 2012; Yang & Rannala, 2012).

La reconstrucción filogenética bayesiana se realizó mediante el software *MrBayes 3.2* (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) corriendo simultáneamente dos análisis, cada uno de ellos con cuatro cadenas de Markov con el método Monte Carlo (MCMC) durante un mínimo de  $10^6$  generaciones, hasta que se alcanzó la convergencia (siendo el valor de “*standard deviation of split frequencies*” inferior a 0,01). Se realizó un muestreo cada 100 generaciones.

En el caso del alineamiento resultante de la concatenación de los 5 genes del MLST, se realizó una partición de genes en el set de datos generado (Nylander *et al.*, 2004), seleccionándose en cada caso el modelo evolutivo previamente estimado para cada gen. A su

vez, para evitar la heterogeneidad en las tasa de sustitución, frecuencias de bases o valores de G entre genes (aproximación por distribución gamma), se utilizaron a modo de *priors* las estimas obtenidas mediante el software *jModeltest* para cada uno de los genes (Posada, 2008).

A partir de los gráficos obtenidos para los valores de ML y la convergencia de distribución, se descartaron el primer millón de generaciones a modo de “*Burn-in*”, con el fin de disminuir la dependencia de la topología del árbol del punto de inicio de las cadenas de Markov (Nylander *et al.*, 2008). Para la visualización gráfica de los resultados se utilizó el software *Tracer* v1.5. (Rambaut & Drummond, 2009). Se realizó una segunda réplica para confirmar la topología obtenida por Inferencia Bayesiana, con el fin de evitar topologías erróneas como consecuencia de una mezcla inadecuada de las cadenas de Markov, o la falta de convergencia.

El soporte de las ramas internas fue evaluado mediante el cálculo de las probabilidades posteriores. En general, se consideraron como clados con suficiente soporte estadístico a aquellos cuya probabilidad posterior fue superior a 0,95 (Huelsenbeck & Rannala, 2004).

#### **20.4 Recombinación.**

Tras el fenómeno de las mutaciones puntuales, los mecanismos más importante por los que las bacterias generan diversidad genómica son la recombinación, y las reorganizaciones de su genoma (duplicaciones, inversiones...) (Smith *et al.*, 1993; Feil *et al.*, 1999; Feil *et al.*, 2000; Lawrence & Hendrickson, 2003). Sin embargo la detección de la señal de recombinación entre dos moléculas, supone en ocasiones un reto. En general, para ello se requiere (Salminen & Martin, 2009):

- (i) Un alto número de secuencias, que incluya tanto los parentales como los recombinantes.
- (ii) Que los parentales sean suficientemente diferentes para detectar al menos una de sus secuencias en los recombinantes.
- (iii) Que las secuencias candidatas no puedan explicarse por convergencia adaptativa.
- (iv) Que la recombinación no ocurriera hace tanto tiempo como para que su señal haya sido borrada por la posterior evolución de las secuencias.

En nuestro caso se empleó el paquete informático *RDP4* (Martin *et al.*, 2010a) en su versión v4.16, que permite implementar diferentes test para la detección de eventos únicos de recombinación, tales como el *GENECONV* (Padidam *et al.*, 1999), *MAXCHI* (Maynard Smith,

1992b), *CHIMAERA* (Posada & Crandall, 2001b), *SISCAN* (Gibbs *et al.*, 2000), *PHYLPRO* (Weiller, 1998) y *3SEQ* (Boni *et al.*, 2007).

Sin embargo, pese a la reciente mejora de los algoritmos de búsqueda, y su eficiencia en localizar puntos de recombinación, la identificación de recombinantes frente a sus secuencias parentales es complicada, y requiere un profundo análisis posterior por parte del investigador, que le permita identificar las secuencias recombinantes, lo que añade subjetividad un proceso hasta este punto muy estandarizado.

Tanto en el caso de los genes individuales, como en el conjunto de datos concatenados, se realizó una exploración de los eventos de recombinación considerando que las secuencias eran circulares, y aceptando únicamente eventos cuyo p-valor fuese inferior a 0,01, aplicando la corrección de Bonferroni. Se seleccionó una ventana de 200pb en los métodos *MAXCHI* y de 100 pb en el caso del método *CHIMAERA*. Posteriormente, todos los recombinantes fueron corroborados manualmente.

El tamaño de la ventana óptima debe ser modificado acorde con las secuencias analizadas y con el tamaño de los fragmentos recombinantes que desean ser detectados. Debido a que el método *MAXCHI* examina únicamente posiciones variables, el tamaño de la ventana se referirá en todo caso al número de éstas, y no al número de residuos nucleotídicos. Para seleccionar regiones recombinantes que incluyan aproximadamente 100 posiciones variables, el tamaño óptimo de la ventana será 200, debido a que el método *MAXCHI* divide en dos mitades las secuencias comparadas (Maynard Smith, 1992a).

## **20.5 Comparación de topologías.**

En los casos en los que fue necesario y con el fin de comparar las topologías obtenidas mediante las distintas metodologías de inferencia filogenética, se realizaron análisis de topologías utilizando los test AU (*approximately unbiased*) (Shimodaira, 2002), *Kishino-hasegawa* (KH) (Kishino & Hasegawa, 1989) y el test de *Shimodaira-Hasegawa* (SH) (Shimodaira & Hasegawa, 1999) implementados en el software *CONSEL* (Shimodaira & Hasegawa, 2001), así como el software *TREE-PUZZLE* (Schmidt *et al.*, 2002).

## **21 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE WOLBACHIA** **AMPLIFICADAS.**



Las cepas descritas en *Chorthippus parallelus*, fueron inicialmente caracterizadas en función del *gen 16S rRNA*, tal y como describen (Martínez *et al.*, 2009; Zabál-Aguirre *et al.*, 2010). Posteriormente, como proponen Baldo *et al.*, (2006b) las secuencias idénticas para cada uno de los *loci* analizados como parte del MLST fueron identificadas con un número. Este número representará un determinado alelo para ese *locus* (ver Fig. 14).

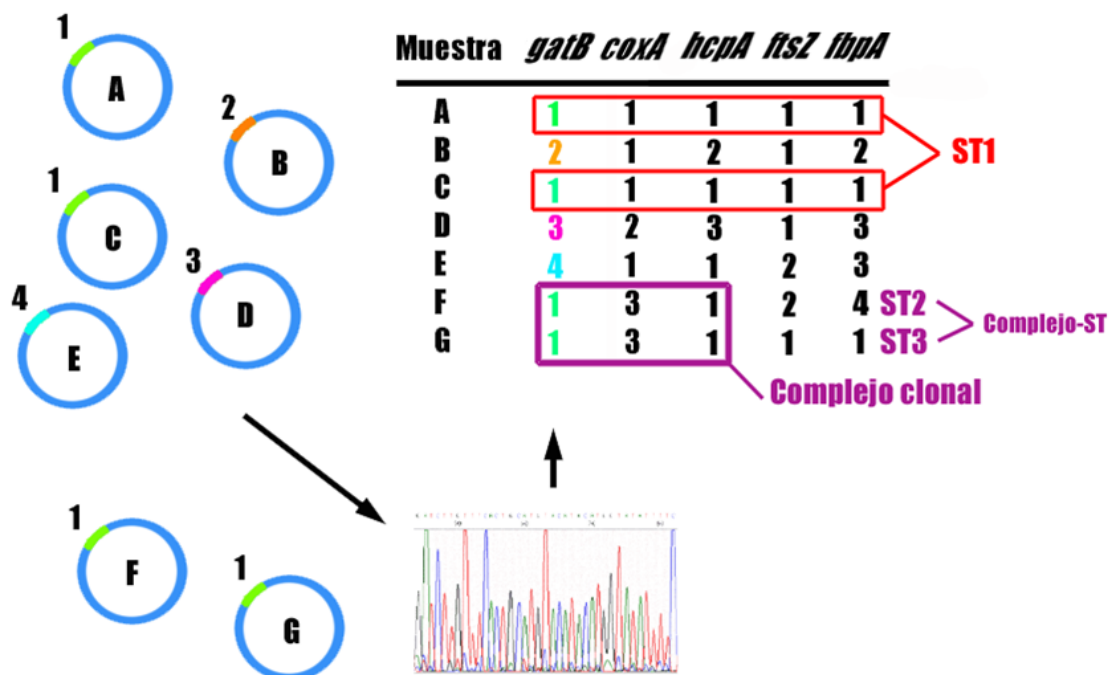


Fig. 14: Esquema explicativo de la asignación de STs y complejos ST. Distintas bacterias (A-G) presentan distintos alelos para cada *loci* (por ejemplo, alelos 1 a 4 del *locus gatB*). Tras la asignación de los distintos alelos, se considera una cepa (o ST) a cada combinación de alelos para los distintos *loci* de un individuo. A su vez, se consideran cepas pertenecientes a un mismo complejo clonal, o complejo ST, a aquellas cepas que comparten 3 alelos.

De este modo, cada cepa bacteriana se caracterizará por una combinación de 5 alelos que definirán un ST (“Sequence Type”) concreto. Este ST caracterizará a cada cepa aislada de la bacteria. Cepas que difieran en un único alelo, se consideran SLV (“single locus variables”). A su vez, pueden definirse como complejos-ST a aquellos ST que compartan el mismo alelo para al menos 3 *loci*.

Estos 3 alelos compartidos se interpretan como el núcleo del genotipo ancestral del clon bacteriano que dio lugar al actual complejo. Por ello, los complejos ST pueden interpretarse

como complejos clonales. La asignación de complejos ST fue realizada mediante el software *START2* ("*Sequence Type Analysis and Recombinational Tests*") (Jolley *et al.*, 2001).

Por otro lado, aquellas ST que difieren sólo en un *locus* ("*Single-Locus Variants*" o SLVs), representarán los estadios iniciales de diversificación del complejo clonal (Maiden *et al.*, 1998; Baldo *et al.*, 2006b).

La clasificación de las cepas bacterianas se completa mediante la caracterización de las 4 regiones hipervariables del gen *wsp* (Baldo *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2006b). Este sistema no está consolidado entre la comunidad científica, debido a los problemas que presenta por la elevada recombinación que se ha detectado en este gen. Sin embargo, su análisis puede ser útil para apoyar al sistema MLST. A su vez, el potencial rol que este gen y la proteína resultante puede tener en la interacción entre bacteria y hospedador (Baldo *et al.*, 2005), hace que merezca la pena su análisis de cara a futuros estudios.

Tras la caracterización de los distintos STs, se estimó la frecuencia de dichos complejos para las poblaciones estudiadas. A su vez, para cada *locus*, se estimó la frecuencia de cada uno de los alelos en cada una de las poblaciones. Para ello, en primer lugar se estimaron las frecuencias relativas de los supergrupos F y B en las poblaciones analizadas. Debido a que en algunas de las poblaciones muestreadas, el número de individuos infectados por los supergrupos F o B era muy escaso, fue necesario seleccionar individuos de varias poblaciones cercanas para la posterior amplificación y secuenciación de los genes del MLST. Por ejemplo, en esta parte del estudio, se considerarán las poblaciones de Arudy, Gabas, L'Hermine y Soques como una única población denominada "ZH (Francia)". Las agrupaciones responden a la detección de los mismos STs en las poblaciones implicadas, así como a sus características similares en cuanto a los niveles de infección y su cercanía geográfica. En este caso, las frecuencias relativas en esta "nueva población" se estimaron como una media de las frecuencias relativas de los distintos muestreos.

Se establecieron de este modo, 14 poblaciones: (i) *ZH (Francia)*, ya mencionada, (ii) *C. Tourmont*, (iii) *Portalet*, (iv) *Corral de Mulas*, (v) *Sallent de Gállego*, (vi) *Escarrilla*, (vii) *Pirineo Sur* (que incluye las poblaciones de Pto. Cantó y Sabiñánigo), (viii) *Vielha*, (ix) *Zona Centro* (Navafría, Gredos...), (x) *Bubión*, (xi) *Norte* con las poblaciones del P. Vasco, Navarra, Asturias y Galicia, (xii) *Alpes*, que recoge las poblaciones de Col de L'Arche, Valdieri y L'Argentera, (xiii) *Ingllaterra (Epping Forest I)* y (xiv) *Eslovenia*. En los análisis implementados para el supergrupo B, se excluirá Inglaterra. En los análisis del supergrupo B se excluirá Bubión.

En todos los casos, se estimó la frecuencia de los distintos alelos para cada gen, así como de cada ST en cada una de las poblaciones. Dicha estima se realizó teniendo en cuenta las frecuencias de infección por F y B de cada población, y a su vez, las frecuencias de los distintos

alelos obtenidos a partir de los individuos F y B analizados en cada población. Esta estima debe de ser considerada con cuidado, debido al tamaño muestral reducido. Todo ello permitió la construcción de las Fig. 50 a Fig. 56, donde quedan reflejados los distintos alelos de los diferentes *loci* detectados en cada población.

En todos los casos, para distinguir los ST descritos en la bibliografía y disponibles en las bases de datos, respecto a aquellos descritos en *C. parallelus*, la nomenclatura de éstos seguirá el esquema Cp\_ST (Número).

## **22 ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE *WOLBACHIA* INFECTANDO A LAS DISTINTAS POBLACIONES.**

### **22.1 Análisis de la estructuración genética de las poblaciones mediante el software *Structure*.**

Con el fin de caracterizar la estructuración genética de las poblaciones, se realizó un análisis mediante el software *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000), dado que una de sus aplicaciones incluye la posibilidad de inferir, a partir de un conjunto de datos individuales, un número de poblaciones genéticas, asignando los distintos individuos a cada una de las poblaciones inferidas. Su uso es habitual para distintos tipos de marcadores genéticos: SNPs, microsatelites, RFLPs y AFLPs.

Dicho software implementa un algoritmo de agrupación (basado en un modelo matemático concreto definido por el usuario) para inferir la estructura genética de la muestra, utilizando como datos de partida los genotipos de los individuos. Esta metodología permite demostrar la existencia de estructura poblacional, identificando distintas poblaciones genéticas (lo cual no tiene porqué corresponderse con poblaciones geográficas definidas). El modelo asume K poblaciones genéticas, cada una con una determinada frecuencia de alelos. Posteriormente, los individuos se asignan a las poblaciones y se calcula la probabilidad de que dicha asignación sea adecuada.

En primer lugar, se generaron archivos de datos que contenían los alelos detectados en cada individuo para cada uno de los *loci* del MLST, siguiendo la numeración propuesta en la (tabla 6). A su vez, se generaron archivos de datos en formato *eXtended Multi-Fasta* (XMFA) en los que se incluyó la información referente a las secuencias de los 5 *loci* del sistema de clasificación multilocus. Estos archivos se reconvirtieron a un formato adecuado para el software

*Structure*, recodificando las secuencias de ADN, y utilizando únicamente la información de aquellas posiciones caracterizadas como polimórficas. Esta recodificación fue realizada mediante el software *Xmfa2struct* (<http://www.stats.ox.ac.uk/~didelot/files/xmfa2struct.pdf>) diseñado por Xavier Didelot, incorporando las distancias entre cada posición polimórfica. En el archivo de datos, se mantuvo la separación entre los 5 *loci* del MLST, y se incluyó la distancia relativa entre las posiciones polimórficas. Para una descripción detallada de los algoritmos se recomienda consultar la documentación del Software:

([http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure\\_software/releaseversions/v2.3.4/structuredoc.pdf](http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/releaseversions/v2.3.4/structuredoc.pdf)).

Con el fin de determinar el número de poblaciones genéticas existentes en la muestra (utilizando ambos archivos de datos, aquel que incluía la asignación alélica de cada individuo, y aquellos que incluían la codificación de las posiciones polimórficas de las 5 secuencias concatenadas), se analizaron las muestras pertenecientes a los supergrupos F y B de manera simultánea. Para ello, se realizaron 10 simulaciones independientes, para unos valores de  $K=1$  a  $K=8$ . Cada simulación consistió en 250.000 iteraciones, descartando las primeras 100.000 a modo de “*burn-in*”, para evitar el efecto del punto de partida sobre el valor de los parámetros. Se calculó en todos los casos la probabilidad posterior de los datos, dado el valor de  $K$ . Esto es  $L(K)=Pr(X|K)$ .

La convergencia de las cadenas de Markov y su mezcla, se comprobó de forma indirecta, mediante la coherencia de los resultados de simulaciones independientes con el mismo valor de  $K$ . Por otro lado, se calculó el valor óptimo de  $K$  utilizando dos metodologías complementarias.

En el primer caso, se consideró el valor óptimo de  $K$ , a aquel que maximiza la probabilidad de obtener los datos, dado un valor de  $K$ . Esto es, maximiza el valor de  $L(K)=Pr(X|K)$ . Tal y como se describe en la documentación del software, en el caso de detectarse una meseta en las probabilidades, se tuvo en cuenta el menor valor de  $K$  que explique la diversidad observada en los datos. Por otro lado, según describen Evanno *et al.* (2005), se calcularon y representaron los valores de  $L'(K)$ ,  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ . Siendo  $L'(K) = L(K)-L(K-1)$  el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de  $K$  consecutivos; siendo  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de  $K$  observadas en el apartado anterior, y  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ , el incremento de  $K$ . Esta metodología fue implementada mediante el software *Structure Harvester*, que a su vez permitió su representación gráfica (Earl & vonHoldt, 2012).

Tras determinar el valor óptimo de  $K$ , se procedió a verificar la subdivisión de los supergrupos F y B respectivamente (para ambos tipos de datos). Para ello, y siguiendo las recomendaciones del manual, se repitió el análisis anterior, para valores de  $K=1$  a  $K=8$  utilizando

únicamente la población que se sospecha está subdividida, en nuestro caso el supergrupo F y B (Coulon *et al.*, 2008).

En el caso de del primer archivo de datos, en el que las poblaciones son asignadas en función del archivo alélico de cada individuo, se implementó el modelo *Admixture*. Los autores del software recomiendan dicho modelo como un primer acercamiento a la gran mayoría de los datos genéticos, siendo suficientemente flexible para adaptarse a estructuras poblacionales complejas y permitiendo la posibilidad de que el genoma de un organismo tenga varios orígenes.

De manera general, *Structure* asume que los marcadores no están ligados, sin embargo, puede considerarse ligamiento leve entre marcadores mediante la selección del modelo *linkage model*, y la incorporación de las distancias entre los *loci* en el archivo de datos. Esta metodología ha sido empleada en estudios bacterianos en los que se analizan posiciones polimórficas potencialmente ligadas. En nuestro caso, la detección de recombinación nos hizo seleccionar el modelo *Admixture* con el fin de determinar el valor óptimo de K (Falush *et al.*, 2003b; Didelot *et al.*, 2011). Consideramos que su uso puede justificarse tras observar los resultados obtenidos, dada la buena resolución para nuestros datos, así como su buena correspondencia con el resto de análisis.

## 22.2 Análisis Bayesiano de Genealogías.

A su vez se completó el estudio con un “Análisis Bayesiano de Genealogías”, mediante el paquete informático *ClonalFrame* (Didelot & Falush, 2007). Dicho software está diseñado de forma específica para el análisis de MLST y utiliza una aproximación Bayesiana para estimar, por un lado las relaciones clonales entre bacterias y por otro, localizar los eventos de recombinación que puedan explicar la aparición de nuevas cepas (Didelot & Falush, 2007).

Se programaron cinco réplicas de cada simulación en cada uno de los casos (secuencias correspondientes al supergrupo F, secuencias correspondientes al supergrupo B, y secuencias disponibles en la base de datos correspondientes a los supergrupos A, B, D y F). Cada réplica fue ejecutada durante 250.000 iteraciones de las Cadenas de Montecarlo (MCMC), iniciándose el análisis a partir de un árbol de topología aleatoria y eliminándose las 100.000 primeras iteraciones como “*burn-in*”. Se muestrearon los árboles obtenidos cada 100 iteraciones.

La convergencia de las cadenas de Markov se evaluó manualmente, mediante la comparación de las cinco réplicas (Gelman & Rubin, 1992; Didelot *et al.*, 2011). La genealogía estimada mediante este software se mide en unidades de tiempo de coalescencia, valor que es



igual al tamaño efectivo  $N_e$  de la población por la duración de una generación (Didelot *et al.*, 2011).

### 22.3 Análisis de la varianza molecular o test de AMOVA.

Por otro lado, se realizó una variante del test de AMOVA (*“Analysis of MOlecular VAriance framework”*), a partir de las frecuencias de los distintos STs detectados en individuos pertenecientes al supergrupo F (basándonos en el gen *16S rRNA*) de cada población. Se realizó un análisis equivalente entre los STs pertenecientes al supergrupo B según esta misma consideración. Esta clasificación supuso la inclusión de gran parte de los STs considerados como recombinantes en el archivo de datos del supergrupo F, dado que gran parte de éstos habían sido clasificados como pertenecientes al supergrupo F en función del gen *16S rRNA*.

Se computó la red de mínima diferenciación (*“Minimum Spanning Network”*) entre los diferentes haplotipos o STs. Esta metodología analiza la estructuración genética de las distintas poblaciones bacterianas usando para ello las frecuencias de los distintos STs, así como su distancia genética, calculada en este caso a partir de las secuencias nucleótídicas de los STs bajo el modelo de Tamura-Nei (Excoffier *et al.*, 1992). La significación de los componentes de la covarianza asociados a los distintos niveles de diferenciación (entre individuos, entre poblaciones, dentro del grupos de poblaciones y entre grupos), se testaron usando el procedimiento de permutaciones no paramétricas propuesto por Excoffier *et al.* (1992), y que consiste en la reorganización al azar de las distintas poblaciones en los distintos grupos propuestos y su evaluación estadística. Dicho análisis fue realizado mediante el Software *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005). Se testaron varias hipótesis, modificándose el número de grupos, y las poblaciones adscritas a dichos grupos.

#### *AMOVA locus by locus.*

El análisis previo se confirmó mediante un test AMOVA *locus by locus*, implementado a su vez en *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005) Para ello, se requirió que el archivo original estuviera compartimentalizado para cada uno de los *loci* analizados.

#### *Exact test of population differentiation.*

Para confirmar los datos anteriores se realizó un *“Exact test of population differentiation”*. Este test, implementado también en *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005), permite evaluar la hipótesis de que los individuos se encuentren distribuidos de forma aleatoria en cada

par de poblaciones, tal y como describieron (Raymond & Rousset, 1995). Este test sería análogo al “Fisher’s exact test” aplicado a una tabla de contingencia de 2 x 2 (Fisher, 1922), pero extendido a una tabla de contingencia de [a x a] poblaciones.

#### **22.4 Test de Mantel: Correlación entre las distancias genéticas y geográficas, aislamiento por distancia y separación de grupos genéticos.**

Por otro lado, se analizó la diferenciación de los STs (pertenecientes a los supergrupos F o B) en función de la distancia geográfica de las poblaciones en las que habían sido caracterizados, utilizando el test de Mantel. Dicho test analiza la significación estadística de la correlación existente entre una matriz de distancia genética, y una matriz que recoja la distancia geográfica entre las poblaciones. En este caso, la matriz de distancia genética fue computada como los valores de  $F_{ST}$  asociados a haplotipos mediante el Software *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005). Los detalles de la metodología empleada se pueden consultar en el manual del software. La matriz de distancias geográficas entre las 13 poblaciones analizadas fue obtenida mediante el software *Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3*

([http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg)).

### **23 DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES POR PCR-DGGE.**

Parte de este ensayo se realizó en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL, Finca Zamadueñas, Valladolid), en el laboratorio de la Dra. Marta Hernández Pérez. La metodología puede consultarse en Martínez-Rodríguez *et al.* (2013b).

La *PCR-Denaturing Gel Gradient Electroforesis* (PCR-DGGE) consiste en la amplificación por PCR seguida de una electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización que permite la separación de los productos de PCR amplificados en función de su tamaño y contenido en GC, como se ha detallado en la Introducción, pág. 44. Este ensayo de caracterización molecular o *huella genética* fue llevado a cabo en 30 individuos de ambas subespecies de *C. parallelus*, así como en individuos híbridos, seleccionados de los muestreos realizados durante los años 2008 y 2009. Previamente a su inclusión en este estudio, los individuos fueron caracterizados en relación a su infección por *Wolbachia* utilizando las técnicas habituales descritas en el apartado



“Detección de *Wolbachia* mediante PCR”, pág. 65. 24 de ellos fueron caracterizados como infectados.

Posteriormente, se amplificó un fragmento de 580 pb que incluía las regiones variables V3 y V5 del gen *16S rRNA* utilizando para ello los primers universales propuestos por Lane (1991) (R:5'-CCGTCAATTCCTTTGAGT-3'; GC-357F: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGG-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') con la correspondiente modificación en el extremo 5'. Nótese que la secuencia que aparece en cursiva permite incorporar a la secuencia amplificada una cola rica en G+C, necesaria para esta técnica.

La reacción se optimizó para un volumen final de 50 µL, que contenían 1X *buffer*, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTPs, 0.3 mM de cada cebador (907R y GC-357F), 1 U de *Taq ADN polymerase* (Biotools, Madrid, España) y 2 µL de ADN genómico a 50ng/µL. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 3 min, seguido de 5 ciclos de 95 °C durante 30 s, 56 °C durante 45 s, 72 °C durante 45 s, seguidos por 25 ciclos de 95 °C durante 30 s, 54 °C durante 45 s, 72 °C durante 45 s y una extensión final de 10 min a 72 °C.

10 µL de cada producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 2% p/v teñido a mediante bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y visualizado con irradiación UV mediante un transiluminador *Molecular Imager® Gel Doc™ XR* (Biorad, Hercules, CA, USA) para confirmar su amplificación. Tras la comprobación, 20 µL de los productos de PCR fueron cargados en un gel de poliacrilamida con un gradiente vertical de desnaturalización, desde el 20% al 80% de Urea/Formamida. La electroforesis se realizó utilizando el DCode™ *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 60 °C en 0.5X TAE *buffer* durante 16 h a 85V. Tras la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 mg/mL) durante 30 minutos para su visualización en un transiluminador ultravioleta *Molecular Imager® Gel Doc™ XR*.

Una vez caracterizado el patrón de bandas del DGGE, se escindieron las bandas utilizando un bisturí estéril. Las bandas se incubaron en agua MilliQ® durante 5 minutos a 98°C, tras lo cual fueron conservadas a -20°C hasta su utilización como molde en una nueva PCR. Para esta nueva amplificación se utilizaron los cebadores 907R/357F (sin la cola rica en G+C) (Lane, 1991). La reacción de PCR fue optimizada para un volumen final de 50 µL, que contenían 1X *buffer*, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTPs, 0.3 mM de cada cebador (907R y 357F), 1 U de *Taq ADN polymerase* (Biotools, Madrid,) y 2 µL del purificado resultante de la incubación de las bandas del gel de acrilamida. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 95 °C 3 min, seguido de 5 ciclos de 95 °C durante 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C durante 45 segundos, seguidos por 25 ciclos de 95 °C de 30 s, 54 °C durante 45 segundos, 72 °C 45 segundos y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) en un transiluminador *ultravioleta Molecular Imager® Gel Doc™ XR*. Las bandas resultantes fueron aisladas con un bisturí estéril. El producto de PCR fue purificado utilizándose el kit comercial *Illustra GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). Los purificados fueron cuantificados mediante *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*.

Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo por Stabvida, Portugal ([www.stabvida.com](http://www.stabvida.com)). Cada secuencia fue comparada mediante la herramienta *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990). Se identificaron como Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) si las secuencias compartían más de un 97% de identidad con la base de datos, siguiendo el criterio expuesto por (Brucker & Bordenstein, 2012b). Las secuencias resultantes pueden ser consultadas en *genbank*, con los códigos JN797635- JN797639.

### **23.1 Detección de Eubacterias mediante PCR.**

Para garantizar que incluso aquellas especie bacterianas que estén presentes en baja densidad, sean detectadas en el estudio de PCR-DGGE, se realizó una amplificación previa utilizándose los cebadores universales para Eubacterias 27F/1492R (Lane, 1991). Mediante estos cebadores se enriqueció la muestra en ADN bacteriano perteneciente al gen *16S rRNA*, de modo que fuese más sencilla la posterior amplificación anidada mediante los cebadores 907R y GC-357F. Este procedimiento de enriquecimiento previo de las muestras fue descrito por Webster *et al.* (2002).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, que contenía 1X *buffer*, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.6 mM de cada cebador, 1.25 U de polimerasa Taq ADN (Biotools) y 2 µL de ADN genómico a 50ng/µL. Las condiciones de la amplificación fueron 1 ciclo de 30 s a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 54°C y 1 min a 72°C, y una elongación final de 10 min a 72°C. Para comprobar la amplificación, se cargaron 10 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% p/v, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). A continuación, se utilizaron 0,5 µL del producto de PCR como molde para la PCR anidada, cuyas condiciones fueron equivalentes a la PCR-DGGE descrita previamente.

### 23.2 Detección y amplificación por PCR del género *Spiroplasma*.

Una vez que el género *Spiroplasma* fue identificado como endosimbionte de *C. parallelus*, se utilizó una pareja de cebadores específicos para amplificar su gen *16S rRNA*. La amplificación fue realizada mediante los cebadores Ha-In-1 (Hurst *et al.*, 1999) y SP-ITS-N2 (Von der Schulenburg *et al.*, 2000). Esta amplificación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas para la PCR general de *Wolbachia*, en un volumen de 50 µL y se cargaron 10 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% p/v, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL).

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit comercial ExoSAP-IT (GE), tal como ha sido descrito previamente. La reacción de secuenciación fue llevada a cabo por Stabvida, Portugal ([www.stabvida.com](http://www.stabvida.com)).

### 23.3 Análisis poblacional de la infección por *Spiroplasma* en *C. parallelus*.

Tras la detección de la infección por *Spiroplasma* en *C. parallelus*, se realizó un análisis acerca de las frecuencias de infección de este endosimbionte en poblaciones naturales de este ortóptero. Este trabajo fue realizado conjuntamente con Charikleia Soultouk, en el marco del proyecto de colaboración con nuestro grupo de investigación titulado “Infección por *Spiroplasma* de poblaciones naturales de *Chorthippus parallelus*”, desarrollado gracias al *EuRopean Community Action Scheme for the Mobility of University Students* (ERASMUS).

Con este fin se analizaron 191 individuos de *C. parallelus* pertenecientes a un total de 19 poblaciones, previamente caracterizadas en relación a su infección por el endosimbionte *Wolbachia*. Para este estudio, y con el fin de analizar la independencia en la infección por ambos endosimbiontes, se seleccionaron individuos infectados por los supergrupos F y B de *Wolbachia*, así como individuos no infectados (Ver Tabla 10, pág. 198).

En todos los casos, la extracción de ADN había sido previamente realizada siguiendo la metodología descrita en la sección “EXTRACCIÓN DE ADN 62. La detección de este endosimbionte siguió la metodología descrita en la sección previa. Se seleccionaron 10 amplificados con el fin de confirmar por secuenciación la secuencia amplificada. A su vez, esta metodología permitió detectar varias variantes del gen *16s rRNA* de esta bacteria. Sus secuencias fueron incluidas para su análisis filogenético.

### 23.4 Análisis filogenético del género *Spiroplasma*.



La metodología fue equivalente a la anteriormente descrita. En primer lugar se construyó el alineamiento incluyendo secuencias procedentes de distintas cepas de los grupos *Spiroplasma*, *Mycoplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Anaeroplasma*, *Phytoplasma*, *Asteroleplasma*, *Clostridium* y, finalmente, la especie *Escherichia coli* a modo de *outgroup*, con el software *Clustal X2* (Larkin *et al.*, 2007). A continuación el alineamiento fue editado mediante el programa *Gblock* (Castresana, 2000).

Se estimó *GTR+ G+ I* como el mejor modelo evolutivo para explicar nuestros datos, con ayuda del software *Jmodeltest* (Posada, 2008). Finalmente, se reconstruyó el árbol filogenético para esta especie mediante inferencia bayesiana, utilizando el software *MrBayes 3.0* (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) y la metodología de las cadenas de Markov durante 10 millones de generaciones, muestreando cada 100 generaciones. Se descartaron a modo de *Burn-in* el 25% de los árboles iniciales para evitar el efecto del punto de inicio.

### **23.5 Análisis de la independencia entre ambos endosimbiontes.**

Para valorar la independencia entre las infecciones por *Spiroplasma* y *Wolbachia* en *C. parallelus* se implementó un modelo *Log-linear* (García Pérez, 2005) utilizando para ello el software estadístico *R 2.13.2 environment* (R Development Core Team, 2008). La independencia entre la infección por *Spiroplasma* y el sexo del hospedador fue analizada mediante el software estadístico *IBM SPSS 19*, a través de un test de G (Sokal & Rohlf, 2012).

## **24 DETECCIÓN DE WOLBACHIA MEDIANTE FISH,** **IMPLEMENTACIÓN DE LA WCH.**

La técnica *Whole Cell Hybridization* (WCH) es una variante de la hibridación fluorescente *in situ* empleada generalmente para la detección de procariotas en distintos ambientes (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). Esta técnica, implementa la hibridación mediante sondas específicas sobre el ARN bacteriano, en nuestro caso, bien sobre el *16s rRNA* de la bacteria, o bien el ARN del gen bacteriano *wsp* (*Wolbachia surface protein*). Debido al elevado número de copias de ARN sobre el que pueden hibridar las sondas, el citoplasma bacteriano emite fluorescencia en su conjunto, siendo la señal lo suficientemente potente para su detección. La hibridación se realizó, tanto sobre secciones de tejido previamente incluido en parafina, como



en aplastados de testículo de *C. parallelus*. La metodología empleada en la hibridación está descrita en (Martínez *et al.*, 2009; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b; Pita *et al.*, 2013).

Se diseñaron sondas específicas marcadas en su extremo 3' con biotina. Dichas sondas se revelan mediante la utilización de fluorocromos con rango de emisión en rojo, unidos a una molécula de avidina. En nuestro caso, se eligió el fluorocromo *TexasRed*<sup>®</sup>, que se excita a 596nm y emite a 615nm. El motivo de esta elección fue la alta autofluorescencia del tejido, ligeramente menos intensa en rojo. Las sondas diseñadas fueron 16s\_1: 5'- TTG TAG CTT GCT ATG GTA TAA CT-3' y 16s\_2: 5'-ACT GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3', en el caso del gen *16S rRNA* y wsp\_1: 5'-AAA CCA GCA CCA TAA GAA CC-3' and wsp\_2: 5'- TGT GAG TAA AGT CCT TCA ACATC -3', en el caso del gen *wsp*. Estas últimas fueron modificadas a partir de las sondas diseñadas por Heddi *et al.* (1999) basándonos en la secuencia de dicho gen en las cepas de *Wolbachia* que infectan *C. parallelus*.

Como se indicó en la sección de muestreos, parte de los individuos fueron seleccionados para la detección de *Wolbachia* mediante esta variante de FISH. En estos casos, la gónada fue separada en dos mitades. Parte de la misma fue fijada en alcohol del 100% con el fin de extraer ADN genómico, y parte fue fijada en formaldehído con el fin de su procesamiento histológico. Se procedió a la detección de *Wolbachia* en individuos en los que previamente se había detectado la infección por esta bacteria mediante PCR, usando como molde el ADN genómico obtenido tras su extracción de la mitad de la gónada que fue fijada en etanol. De igual modo, se seleccionaron para este análisis individuos no infectados a fin de ser empleados como controles negativos.

## 24.1 Detección en tejido.

Una vez fijado, el tejido fue embebido en parafina para la posterior obtención de cortes histológicos mediante un micrótopo manual. Para facilitar la fijación del material, éste se cubrió con formaldehído 37%, en dilución 1/10, durante 12 h, tras lo cual se sustituyó el fijador por fijador limpio durante otras 12 h. A continuación, se lavó durante media hora en agua destilada, se cambió el agua por agua limpia y se lavó durante otra hora. A continuación, el tejido se sumergió en etanol al 30% durante 1 h, para comenzar la deshidratación de la muestra. Cambiamos el etanol por etanol limpio tras media hora. Repetimos el mismo procedimiento con etanol de 50% y 70%. El tejido se conservó en etanol 70% a 4°C hasta su utilización.

Dado que la parafina no es miscible en agua, es necesario sustituir el agua presente en el tejido por heptano. Para ello, se deshidrató la muestra mediante lavados seriados en alcoholes, de gradación creciente: se sumergió la muestra en etanol 70% durante 1 hora, cambiándolo por



etanol limpio transcurrida media hora. Se repitió el proceso con etanol 96% y etanol 100%, permaneciendo el tejido sumergido en cada paso 1 hora, sustituyendo el etanol por etanol limpio a la media hora. A continuación, la muestra se sumergió en heptano durante 15min a temperatura ambiente, y en heptano a 56°C durante otros 15 minutos para atemperarlo. Por ultimo, el tejido se introdujo en parafina líquida (56°C) para la impregnación del tejido. El tiempo requerido difirió según el tamaño de la pieza. Interpretamos que la impregnación es buena si la pieza se hunde hasta el fondo del recipiente.

Tras embeber la pieza, se vertió parafina líquida en un molde atemperado a 56°C, y se introdujo la pieza en el centro. La recolocación de la pieza debe realizarse siempre con unas pinzas atemperadas a 56°C para evitar que la parafina se pegue a éstas. Los bloques se etiquetaron para su posterior identificación antes de dejarse enfriar a temperatura ambiente.

Una vez obtenido el bloque, este se talló y se unió a un taco de madera mediante parafina líquida, lo que facilitó su colocación en el micrótopo para la realización de los cortes.

Se obtuvieron cortes de 5mm de tejido que fueron montados en portaobjetos pre-tratados con poli-L-lisina. Para la preparación de los portas pre-tratados, se disolvió la solución comercial 0,1% p/v de poli-L-lisina en agua destilada 1/10. A continuación, los portaobjetos se sumergieron durante 30 min en la solución y se aclararon con agua destilada. Finalmente, los portaobjetos se dejaron secar, siempre cubiertos por un paño para evitar la acumulación de polvo.

La calidad de los cortes se evaluó mediante una tinción convencional con Hematoxilina-Eosina. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados mediante pases seriados de 15 min en heptano, etanol 100%, etanol 85%, etanol 70% y agua. A partir de este momento, y siempre que fue posible, los portaobjetos se dispusieron en horizontal para evitar que los cortes se despegaran.

El tejido fue incubado en una solución de 0,1% de pepsina en 0.01M HCl durante 10 min a 37°C. Para ello, se añadieron unos 30 µL directamente sobre el corte, que fue cubierto por un cubreobjetos de *Parafilm*® (*American National Can Company, grupo Fisher, Norwalk, CT, USA*). A continuación el tejido fue pre-incubado en el *buffer* de hibridación (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) a 48°C en una cámara húmeda durante 30 min. Para ello, de nuevo, se añadieron aproximadamente 30 µL directamente sobre el corte, que fue cubierto con un cubreobjetos de *Parafilm*®. Tras esta primera incubación, se añadieron 50 ng de cada una de las sondas a testar (16s\_1 y 16s\_2, o wsp\_1 y wsp\_2) a la mezcla de hibridación que cubría el tejido, y los cortes volvieron a incubarse durante 3 h en una cámara húmeda.



Tras la incubación, los cubreobjetos se sumergieron en un *copling* que contenía *buffer* de hibridación y se lavaron a 51°C durante 20 min utilizando un baño. A los 20 min, se renovó el *buffer* y se lavaron durante otros 20 min. Las preparaciones fueron aclaradas brevemente con agua destilada y a continuación, y de nuevo en horizontal, se incubaron con un bloqueante BSA (albúmina sérica bovina) durante 5 min seguido de una incubación con *Avidina-Texas Red*® durante 25 min. A partir de este momento, se trabajó en todo momento en oscuridad.

Las preparaciones se lavaron 3 veces en 4T (4x SCC, 0.1% Tween 20) y una cuarta vez en agua destilada. Cada lavado duró 2 min. Como consecuencia de la autofluorescencia del tejido, los núcleos pueden identificarse fácilmente como cavidades sin fluorescencia, rodeados de un citoplasma autofluorescente. Sin embargo la contratinción de los núcleos con el colorante adecuado mejora la visualización de las preparaciones. En este caso, se eligió una contratinción con 4,9,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Una solución 0.2 µg/mL de DAPI fue mezclada en proporción 1:1 con un el medio de montaje y *antifading Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Esta mezcla será usada para teñir y montar las preparaciones (ver Fig. 15).

Como hemos comentado previamente, esta FISH modificada permite la hibridación específica sobre el ARN bacteriano. Debido a ello, y a modo de control, algunos cortes de individuos previamente caracterizados como infectados, se incubaron con RNasa (30 µg/mL) durante la noche previa a su hibridación en paralelo con cortes no tratados. De este modo esperábamos detectar posibles artefactos.

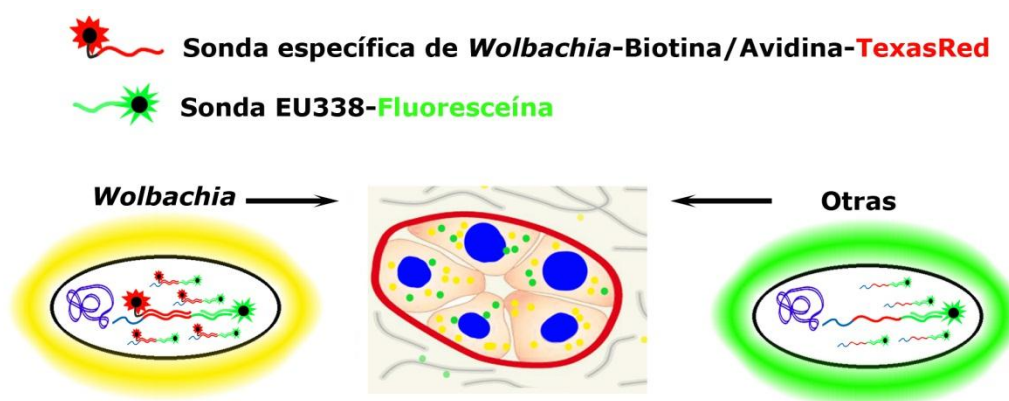


Fig. 15: Esquema mostrando el fundamento de la hibridación. La hibridación simultánea de las sondas roja y verde (únicamente en las células de *Wolbachia*), dará lugar a una señal amarilla al superponerse los canales. La hibridación mediante la sonda EU338 de cualquier procariota, dará lugar a una señal en verde para el resto de bacterias.

Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMLB, con los filtros adecuados para cada fluorocromo empleado durante las hibridaciones. Las fotografías se tomaron mediante el sistema de imagen *digital camera Leica DFC 350 FX*.

## **24.2 Detección en aplastados de testículo.**

La modificación del protocolo de hibridación permitió ensayar estas sondas sobre aplastados de testículo. Para ello, durante los muestreos se seleccionaron algunos individuos, en los cuales la mitad de la gónada fue fijada en etanol 100% para la extracción de ADN, y la otra mitad fue separada para su fijación, según lo indicado en el apartado “obtención del material biológico”.

Las preparaciones se realizaron mediante la técnica de aplastado. Para ello, se separaron dos folículos de la gónada fijada de un macho en un portaobjetos, se añadió ácido acético al 45%, se colocó un cubreobjetos sobre ellos y se disgregó el material con ayuda de pequeños golpes utilizando la parte trasera de una lanceta. A continuación, se aplastó el material ejerciendo presión sobre el cubreobjetos. Las preparaciones se sumergieron en nitrógeno líquido, y se retiró el cubreobjetos con ayuda de una hoja de bisturí.

Tras este proceso, el material fijado debería estar pegado al portaobjetos. Para su comprobación se observa la preparación mediante un microscopio que disponga de contraste de fase.

La preparación se mantuvo durante 15 min a 48°C con una solución de hibridación modificada (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA), en la que se evitó añadir SDS. El motivo fue que en este caso no se requería la adición de un detergente para la permeabilización del tejido, y añadirlo a la solución de hibridación provocaba grandes alteraciones en la morfología de las células presentes en el aplastado.

A continuación, tal y como se describió en el protocolo de hibridación sobre tejidos, se añadieron 50 ng de cada sonda, y las preparaciones se incubaron durante 3 h en la solución de hibridación modificada. Tras ello, se realizaron dos lavados de 20 min en solución de hibridación a 51°C, y se incubaron las preparaciones en BSA durante 5 min para evitar una señal de hibridación inespecífica. Posteriormente se incubó la muestra con *TexasRed*®-avidina (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) durante 25 min. Tras la incubación, las preparaciones se lavaron durante 2 min en 4T. Tras realizar 3 lavados, se procedió a realizar un último lavado de 2 min en agua destilada, antes de contrateñir y montar las muestras con 4,9,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mezclado con medio de montaje y *antifading Vectashield* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*), tal y como se ha descrito previamente.

Las preparaciones se observaron, al igual que en apartado anterior, en un microscopio de fluorescencia. Debido a las alteraciones morfológicas que sufre el material tras el proceso de hibridación, este protocolo presenta limitaciones, de modo que si bien permite una detección “rápida” de la infección, no permite una descripción histológica de su distribución. Por ello, será preferible la detección en tejido.

## **25 DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE WCH.**

Tras la detección de otros endosimbiontes (principalmente del género *Spiroplasma*) infectando a *C. parallelus*, se procedió a su co-localización en tejido, utilizando para ello una variante del protocolo de WCH comentado con anterioridad (ver Fig. 15). Para ello, en primer lugar se utilizó la sonda comercial EU338 unida directamente a fluoresceína, con el fin de detectar cualquier Eubacteria presente en el tejido. Al mismo tiempo, se emplearon las sondas específicas de *Wolbachia* (16s\_1 y 16s\_2, o wsp\_1 y wsp\_2), con el fin de distinguir este endosimbionte de otros endosimbiontes y bacterias que infectaran a los individuos de *C. parallelus*. La descripción de esta metodología puede consultarse en (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b).

Se seleccionaron, entre los individuos que previamente habían sido fijados para el experimento anterior, individuos infectados por *Wolbachia* y *Spiroplasma*; individuos infectados sólo por *Spiroplasma*, e individuos no infectados. Los individuos infectados por ambos endosimbiontes fueron escogidos para contrastar la especificidad de las sondas de *Wolbachia* durante la doble hibridación. Los individuos infectados únicamente por *Spiroplasma* nos permitieron visualizar la infección por este endosimbionte. Finalmente, los individuos no infectados, nos permitieron inferir cuán frecuentes pueden ser otros endosimbiontes en las gónadas de estos insectos.

Tal y como describimos previamente, al menos dos cortes histológicos de los distintos individuos fueron hibridados en paralelo, uno de los cuales había sido previamente incubado con RNasa durante la noche anterior. Este control adicional nos permitió valorar la presencia de artefactos en la hibridación causados por la unión inespecífica del anticuerpo, o acumulaciones aberrantes de la sonda. El número muestral fue reducido, debido a la necesidad de trabajar con material previamente fijado. Se hibridó sobre cortes de 3 individuos de cada categoría, con excepción de los individuos infectados únicamente por *Spiroplasma*, en cuyo caso solo se dispuso de dos individuos.

Tal y como ha sido descrito, las preparaciones se incubaron en una solución de 0.1% de pepsina en 0.01M HCl durante 10 minutos a 37°C. Para ello, se dispuso la preparación en horizontal y se añadieron aproximadamente 30 µL de la solución de pepsina directamente sobre el tejido. La preparación fue cubierta con un cubreobjetos de *Parafilm*®. Posteriormente el tejido se incubó durante 30 min a 48°C con una solución de hibridación modificada, a la que se había añadido formamida al 10% (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, formamida 10%). Este último compuesto mejora la especificidad de la sonda. A continuación, tal y como se describió en el protocolo de hibridación sobre tejidos, se añadieron 50ng de cada sonda (EU338-fluoresceína y sonda *16S* o *EU338* y sonda *wsp*), y las preparaciones se incubaron durante 3h en la solución de hibridación modificada. Debido a que la sonda EU338 está unida a un fluorocromo, todo el protocolo fue realizado en oscuridad.

Tras la incubación, se realizó un lavado de 20 min en solución de hibridación a 51°C, y se incubaron las preparaciones con *TexasRed*®-avidina (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) durante 25 min. Las preparaciones se lavaron 3 veces en 4T (4x SCC, 0.1% Tween 20) durante 2 min, con un último lavado de 2 min en agua destilada. Se procedió a contrateñir y montar las muestras con 4,9,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mezclado con medio de montaje y *antifading Vectashield* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*), tal y como fue descrito previamente. Las preparaciones se observaron al igual que en apartado anterior, en microscopio de fluorescencia.

# RESULTADOS.

## 26 INFECCIÓN DE *WOLBACHIA* EN *C. PARALLELUS*. FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.

En esta parte del estudio se analizaron las frecuencias de infección por *Wolbachia* mediante amplificación por PCR del gen *16S rRNA* de esta bacteria en poblaciones de *C. parallelus*. Se incluyeron poblaciones europeas e ibéricas, así como aquellas pertenecientes al transecto de la zona híbrida. Las poblaciones analizadas, los años en los que se efectuaron los muestreos, así como el tamaño muestral y las frecuencias de infección, pueden consultarse en el anexo C. Con el fin de conocer la estructura poblacional de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus* se plantearon varios estudios:

En primer lugar se analizaron las frecuencias de infección por los distintos supergrupos de *Wolbachia*. En este sentido, se estudiaron posibles diferencias entre uno y otro sexo, y se compararon las frecuencias de infección en cada una de las poblaciones de la zona híbrida analizadas desde el año 2002 al año 2010, continuando así con las series interanuales iniciadas en estudios anteriores (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Por otro lado, se compararon las frecuencias de infección de distintas poblaciones dentro y fuera de la zona híbrida. Se incluyeron tanto poblaciones europeas, como aquellas muestreadas en la península ibérica. Además, se analizó la estructuración geográfica de las poblaciones. Finalmente, se estudió la variación intra-anual de la infección por este endosimbionte y sus posibles consecuencias en la dinámica de la infección.

### 26.1 Infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*. Variación entre sexos.

Se investigaron las posibles diferencias en la infección entre machos y hembras en cada una de las poblaciones de *C. parallelus* analizadas. Los resultados pueden consultarse en la siguiente sección y en el anexo C. Este análisis mostró que, en general, no existen diferencias significativas en las frecuencias de infección en hembras o machos, salvo en algunas excepciones en las que sí se observó dicho efecto (ver más adelante).

### 26.2 Infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*. Variación interanual.



Como parte del seguimiento anual de las poblaciones, se muestrearon y analizaron varias de ellas a lo largo de los años. Éstas incluían tanto poblaciones de la zona híbrida, como otras de la Península Ibérica. A efectos de este análisis, se consideran significativos aquellos casos cuyo p-valor sea menor a 0,01. En el caso de realizar comparaciones múltiples, se empleó la corrección de Bonferroni. Para ello, se estableció en p-valor límite correspondiente el 95% de significación, siendo  $p=0,05/n$ , y  $n$  el número de conjuntos de datos que se estén comparando.

Debido al cambio metodológico relacionado con la detección de la infección (que incluye el cambio de oligos utilizados en su detección, así como la inclusión de una segunda PCR anidada), se excluyeron del análisis los datos de algunas poblaciones previos a 2005 (ver anexo C). A su vez se excluyeron del estudio aquellas poblaciones que presentaron desviaciones significativas que pudieron relacionarse con un tamaño muestral reducido. De forma global, se observa que las poblaciones pueden presentar variaciones aleatorias en las frecuencias de infección, si bien, estas frecuencias se mantienen dentro de unos márgenes que permitirían seguir clasificando a esas poblaciones en su mismo grupo, en relación a su infección predominante (ver secciones “Infección de *Wolbachia* en *Chorthippus parallelus*. Frecuencias de infección”, pág. 107 y “Estructuración genética de las cepas detectadas”, pág. 256).

A continuación se analizaron de forma independiente cada una de las poblaciones, considerándose si existían o no diferencias significativas a lo largo de los años, o por el contrario las frecuencias de infección se mantenían constantes. Hay que tener en cuenta que las posibles variaciones observadas no tienen porqué significar que las frecuencias no sean estables a largo plazo, si no que podrían ser oscilaciones en torno a un valor que se mantenga en el tiempo. Esta hipótesis sólo podría valorarse a partir de simulaciones matemáticas, que nos permitieran estimar las frecuencias de infección a largo plazo. Este punto del estudio está desarrollándose en colaboración con Rafael Granero-Belinchón (ICMAT), y los resultados preliminares se mostrarán en la siguiente sección.

Para consultar las series temporales correspondientes a cada población, consultar el anexo C.

### *Sabiñánigo.*

Dentro de un mismo año, no se han detectado diferencias entre hembras y machos, salvo en el año 2005 ( $G=25,995$ , g.l.= 3,  $p\approx 0,000$ ), donde sí aparecen. A su vez el análisis de la variación de frecuencias de infección a los largo de los tres muestreos (2004, 2006, 2007) no mostró diferencias significativas (Machos:  $G=11,43$ , g.l.=3,  $p=0,010$ . Hembras:  $G=1,560$ , g.l.=3,  $p=0,668$ . Total:  $G=2,263$ , g.l.=3,  $p=0,252$ ).

### *Biescas.*

En esta población pura Cpe, situada en el extremo sur del Valle de Tena, se observaron diferencias entre machos y hembras en el muestreo correspondiente al año 2005 ( $G=12,060$ ,  $g.l.=2$ ,  $p=0,002$ ). Se han detectado diferencias interanuales en los machos ( $G=27,330$ ,  $g.l.=9$ ,  $p=0,001$ ); y de forma global ( $G=40,864$ ;  $g.l.=9$ ,  $p\approx 0,000$ ) tanto considerando cada tipo de infección, como considerando únicamente infección/no infección. No ocurre así en las hembras ( $G=24,446$ ;  $g.l.=9$ ,  $p=0,003$ ). Estas diferencias se deben principalmente a un déficit de individuos infectados por F en el año 2006, conjuntamente con un incremento de la coinfección en este mismo año.

### *Escarrilla.*

Se observan diferencias interanuales, tanto en machos ( $G=43,223$ ,  $g.l.=18$ ,  $p\approx 0,001$ ), como en hembras ( $G=68,189$ ,  $g.l.=18$ ,  $p\approx 0,000$ ) así como en los datos globales ( $G=61,973$ ,  $g.l.=18$ ,  $p\approx 0,000$ ). El análisis de residuos tipificados corregidos indica que las diferencias se deben en general a un incremento en los niveles de individuos no infectados, asociados a un descenso en el nivel de coinfección (en los años 2009 y 2005), o al nivel de infección por F (en los años 2002, 2006). Se excluyeron los datos de 2008, debido a sus desviaciones respecto a la tendencia general, coincidiendo con un tamaño muestral reducido. Dentro de un mismo año, no se han detectado diferencias entre hembras y machos, salvo en el caso puntual del año 2003, donde un exceso de coinfectados, asociado con un incremento de los no infectados en las hembras, induce que existan diferencias entre sexos ( $G=13,926$ ,  $g.l.=3$ ,  $p=0,003$ ).

### *Sallent de Gállego.*

Se detectan diferencias interanuales, tanto en hembras ( $G=72,363$ ,  $g.l.=24$ ,  $p\approx 0,000$ ), como en machos ( $G=72,363$ ,  $g.l.=24$ ,  $p\approx 0,000$ ), así como en los datos globales ( $G=116,054$ ,  $g.l.=24$ ,  $p\approx 0,000$ ). El análisis de residuos tipificados corregidos indica que las diferencias se deben en general a un descenso en los niveles de individuos coinfectados, asociado a un incremento en el nivel de infección por B (año 2004), o al nivel de no infección (años 2007, 2009 y 2010). Dentro de un mismo año, no hay diferencias entre sexos, salvo en el caso puntual del año 2006, donde estas diferencias sí son significativas ( $G=18,103$ ,  $g.l.=3$ ,  $p\approx 0,000$ ), observándose un descenso en los niveles de infección por B respecto a los esperados., acompañado de un mayor nivel de no infección.

### *C. Mulas.*

Se detectaron diferencias interanuales, tanto en hembras ( $G=43,855$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ), como en machos ( $G=61,109$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ), así como en los datos globales ( $G=81,639$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ). El muestreo correspondiente al año 2008 fue excluido del análisis, al presentar datos discordantes con el resto de datos, posiblemente debidos a un menor tamaño muestral. A su vez, no se detectaron diferencias entre sexos, salvo en el caso puntual del año 2006, donde estas diferencias sí son significativas ( $G=13,266$ , g.l.=3,  $p=0,004$ ), observándose un descenso en los niveles de infección por B respecto a los esperados.

### *Portalet.*

Hay diferencias significativas entre los distintos años, tanto en el caso de los machos ( $G=52,537$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ), como en el caso de las hembras ( $G=57,558$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ), y en su conjunto ( $G=96,200$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ). Dentro de un mismo año, no hay diferencias entre machos y hembras.

### *C. Antigua.*

Hay diferencias significativas entre los distintos años en los machos ( $G=43,936$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ). Estas diferencias desaparecen en el caso de las hembras ( $G=16,400$ , g.l.=10,  $p=0,089$ ). Si no se considera el sexo, las diferencias entre años se mantienen ( $G=51,079$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ). Dentro de un mismo año, no hay diferencias entre machos y hembras.

### *Tourmont.*

No existen diferencias significativas entre los distintos años de muestreo, en el caso de los machos ( $G=23,832$ , g.l.=15,  $p=0,068$ ), ni en el de las hembras ( $G=23,672$ , g.l.=15,  $p=0,071$ ), ni considerando los datos de forma global ( $G=27,674$ , g.l.=15,  $p=0,024$ ). Dentro de un mismo año, no hay diferencias entre machos y hembras.

### *Soques.*

Se han observado diferencias significativas entre los distintos años. En este caso, las diferencias, detectadas en hembras ( $G=50,294$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ) y conjuntamente ( $G=41,174$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ), se deben principalmente al aumento de la infección por B en el año 2009. No se detectaron variaciones significativas en las frecuencias de infección en el caso de los machos ( $G=23,051$ , g.l.=15,  $p=0,083$ ). Tampoco se detectaron diferencias entre machos y hembras en cada uno de los años.





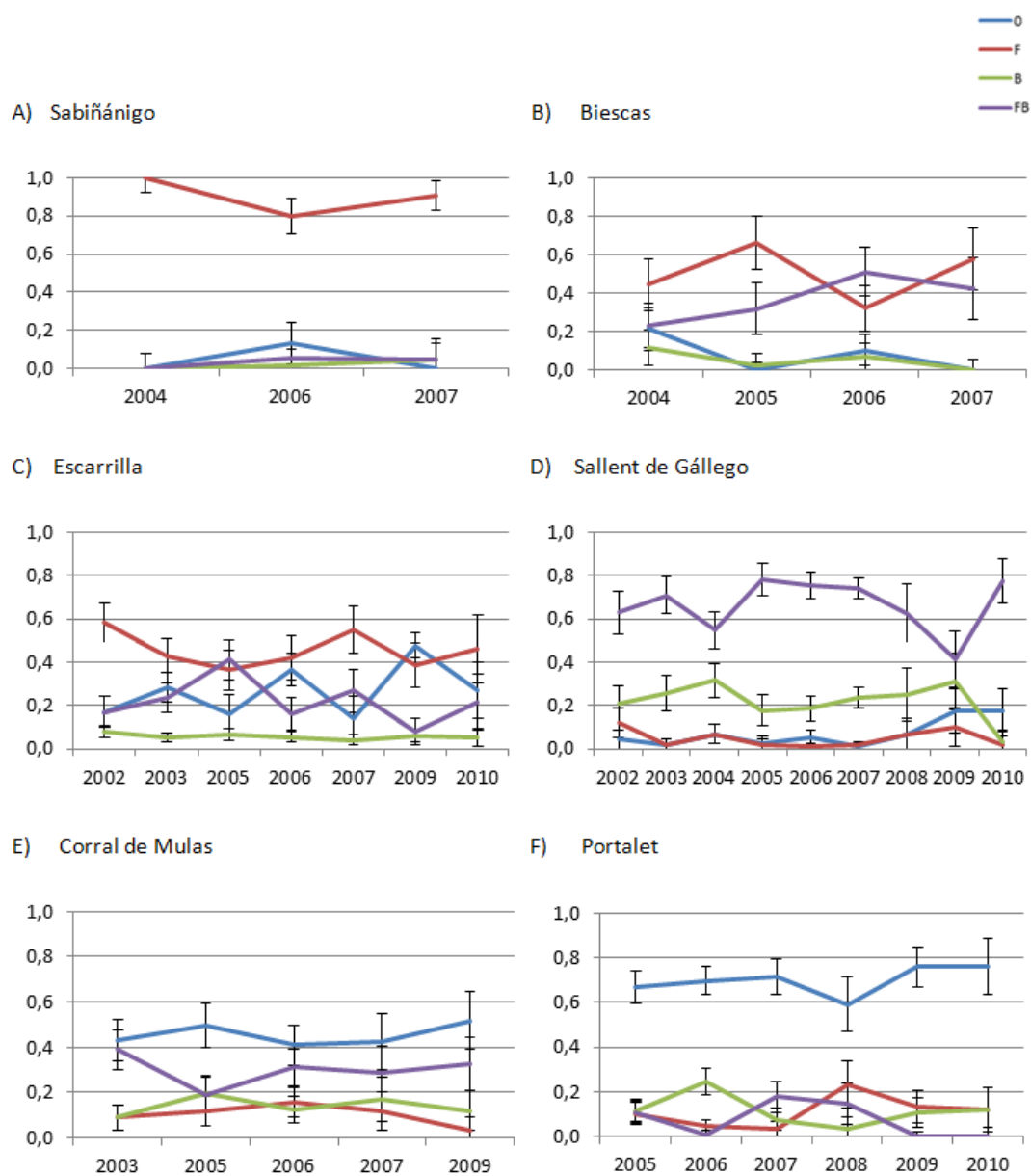


Fig. 16-A a 16-F: Frecuencias de infección por *Wolbachia* (eje y) a lo largo de los años (eje x), en las poblaciones analizadas. Los intervalos de confianza representan 2 veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (1927). La línea azul representa las frecuencias de individuos no infectados, la línea roja indica la de individuos infectados por el supergrupo F, la verde la de individuos infectados por el supergrupo B, y el color morado indica la frecuencia de individuos coinfectados por ambos grupos.

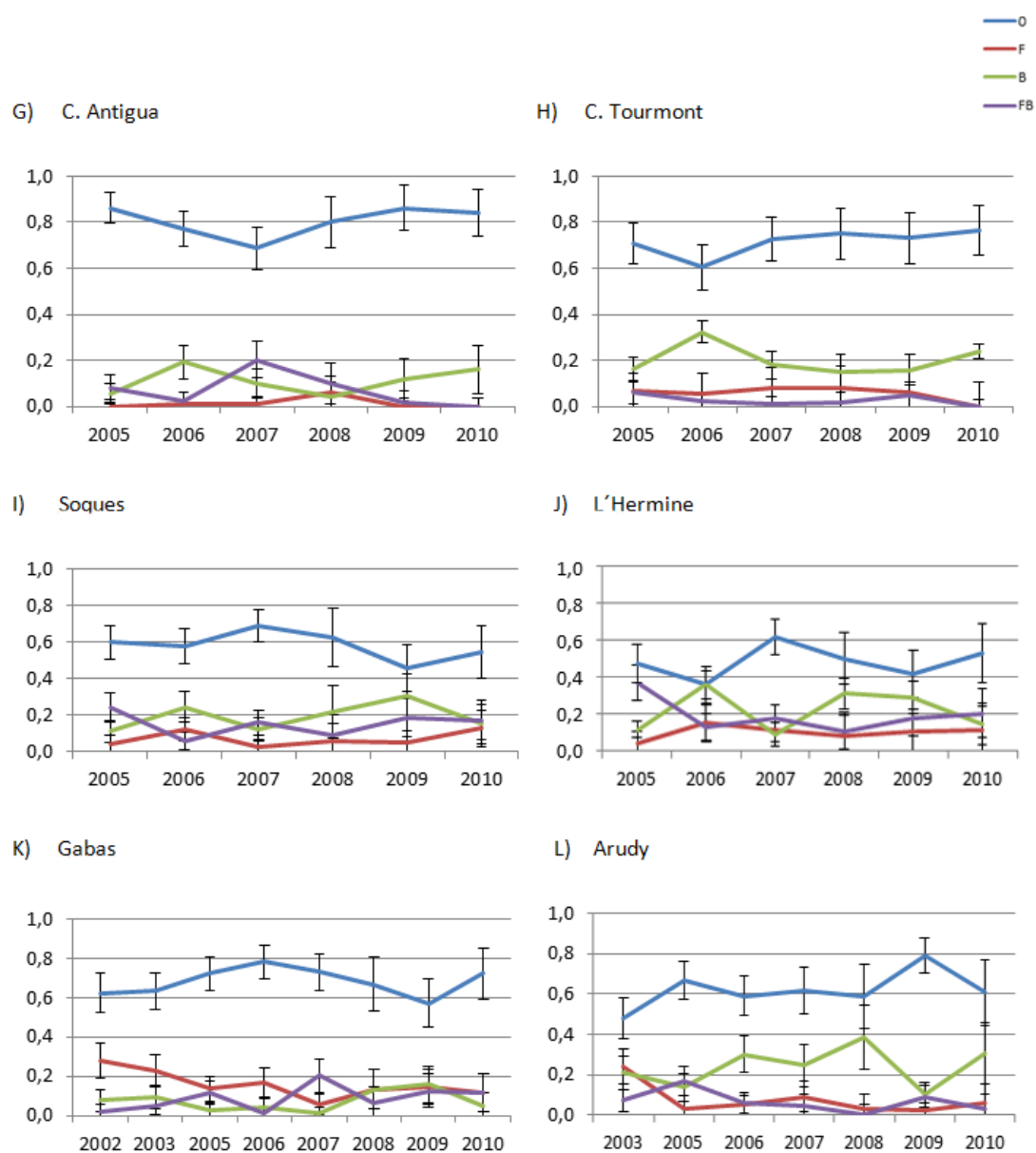


Fig. 16-continuación: 16-G a 16-L: Frecuencias de infección por *Wolbachia* (eje y) a lo largo de los años (eje x), en las poblaciones analizadas. Los intervalos de confianza representan 2 veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (1927). La línea azul representa las frecuencias de individuos no infectados, la línea roja indica la de individuos infectados por el supergrupo F, la verde representa la frecuencia de individuos infectados por el supergrupo B, y el color morado indica la de individuos coinfectados por ambos grupos.

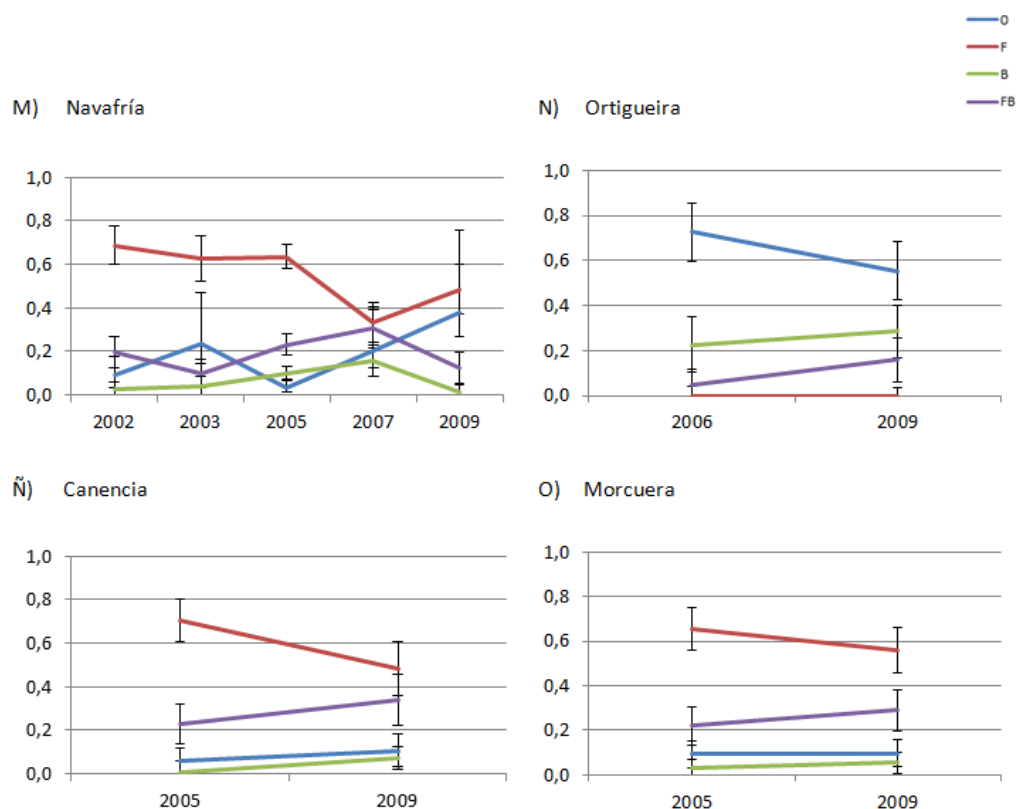


Fig. 16-continuación: 16-M a 16-O: Frecuencias de infección por *Wolbachia* (eje y) a lo largo de los años (eje x) en las poblaciones analizadas. Los intervalos de confianza representan 2 veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (1927). La línea azul representa la frecuencia de individuos no infectados, la roja indica la de individuos infectados por el supergrupo F, la verde representa la frecuencia de individuos infectados por el supergrupo B, y el color morado indica la de individuos coinfectados por ambos grupos.

### *L'Hermine.*

Existen diferencias significativas entre los distintos años, tanto a nivel de machos ( $G=31,373$ , g.l.=15,  $p=0,008$ ), hembras ( $G=38,769$ , g.l.=15,  $p=0,001$ ) y a nivel global ( $G=55,478$ , g.l.=15,  $p\approx 0,000$ ). Las diferencias se deben principalmente al mayor número de coinfectados en el año 2005, así como a las variaciones en la infección por B a lo largo de los años. Dentro de un mismo año, no hay diferencias entre machos y hembras.

### *Gabas.*

Se observan diferencias significativas entre los distintos años, tanto en el caso de los machos ( $G=59,108$ , g.l.=21,  $p\approx 0,000$ ), las hembras ( $G=47,942$ , g.l.=21,  $p=0,001$ ) o en conjunto ( $G=74,132$ , g.l.=21,  $p\approx 0,000$ ). Dentro de un mismo año, no hay diferencias entre sexos, salvo en los años 2003 y 2007, donde sí que se observan diferencias significativas (2003:  $G=15,929$ , g.l.=3,  $p=0,001$ ) (2007:  $G=14,799$ , g.l.=3,  $p=0,002$ ).

### *Arudy.*

Hay diferencias significativas entre los distintos años, tanto a nivel de machos ( $G=50,922$ , g.l.=18,  $p\approx 0,000$ ), como a nivel de hembras ( $G=47,194$ , g.l.=18,  $p\approx 0,000$ ) y de forma global ( $G=74,122$ , g.l.=21,  $p\approx 0,000$ ). No hay diferencias entre sexos (dentro de un año concreto), salvo en los años 2006 y 2007 (2006:  $G=17,353$ , g.l.=3,  $p=0,001$ ), (2007:  $G=15,480$ , g.l.=3,  $p=0,001$ ).

### *Navafría.*

Hay diferencias entre los distintos años, en los machos ( $G=37,437$ , g.l.=12,  $p\approx 0,000$ ), hembras ( $G=122,004$ , g.l.=12,  $p\approx 0,000$ ), y globalmente ( $G=115,633$ , g.l.=12,  $p\approx 0,000$ ). Se han detectado diferencias entre sexos en los años 2003, 2004 y 2009 (2003:  $G=13,772$ , g.l.=3,  $p=0,003$ ), (2004:  $G=13,563$ , g.l.=3,  $p=0,004$ ), (2009:  $G=41,284$ , g.l.=3,  $p\approx 0,000$ ). Se eliminaron los datos correspondientes al muestreo de 2008, debido a su desviación respecto a la tendencia general, posiblemente como consecuencia del pequeño tamaño muestral.

### *Ortigueira.*

No existen diferencias entre los distintos años, ni en los machos ( $G=3,563$ , g.l.=3,  $p=0,168$ ), ni en las hembras ( $G=3,421$ , g.l.=2,  $p=0,181$ ), ni en conjunto ( $G=4,788$ , g.l.=2,  $p=0,091$ ). Este análisis muestra que tampoco existen diferencias entre sexos. Se excluyó del análisis la población del año 2007, al presentar un tamaño muestral reducido.

### *Canencia.*

No ha diferencias significativas entre ambos muestreos, ni entre los machos ( $G=5,735$ , g.l.=3,  $p=0,125$ ), ni entre las hembras ( $G=9,698$ , g.l.=2,  $p=0,008$ ), ni globalmente ( $G=10,096$ , g.l.=3,  $p=0,018$ ). Se observa el incremento de los coinfectados asociado a un descenso de los individuos infectados por F. El muestreo de 2009 muestra un incremento en los niveles de coinfección, afectando principalmente a las hembras. Se han detectado diferencias entre machos y hembras en este mismo año ( $G=18,707$ , g.l.=3,  $p\approx 0,000$ ).

### *Morcuera.*

No hay diferencias significativas entre ambos muestreos, tanto en los machos ( $G=11,437$ , g.l.=3,  $p=0,010$ ), como en las hembras ( $G=1,560$ , g.l.=3,  $p=0,668$ ), y a nivel global ( $G=2,263$ , g.l.=3,  $p=0,520$ ). Se han detectado diferencias entre sexos en el año 2005 ( $G=25,995$ , g.l.=3,  $p\approx 0,000$ ).



Taramundi.

No hay diferencias significativas entre los años 2008 y 2009 (machos:  $G=5,234$ , g.l.=3,  $p=0,155$  / hembras  $G=8,134$ , g.l.=3,  $p=0,043$ / global:  $G=10,337$ , g.l.=3,  $p=0,016$ ). Tampoco hay diferencias entre sexos

Vistos globalmente todos los casos detallados hasta aquí, las poblaciones parecen estables, si bien existen incrementos y descensos en sus frecuencias de infección, aparentemente erráticos y no siempre significativos, tal como había sido descrito con anterioridad (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Pese a ello, cada población presenta una infección mayoritaria por un determinado supergrupo de la bacteria, manteniéndose esa característica a lo largo de los años, pese a las variaciones en frecuencias. Aunque el análisis se ha realizado durante varios años, éste es un periodo de tiempo corto respecto a la dinámica global de la infección, por lo que la tendencia que indicamos debe confirmarse mediante otras metodologías, bien estudios sostenidos a largo plazo, bien mediante simulaciones matemáticas.

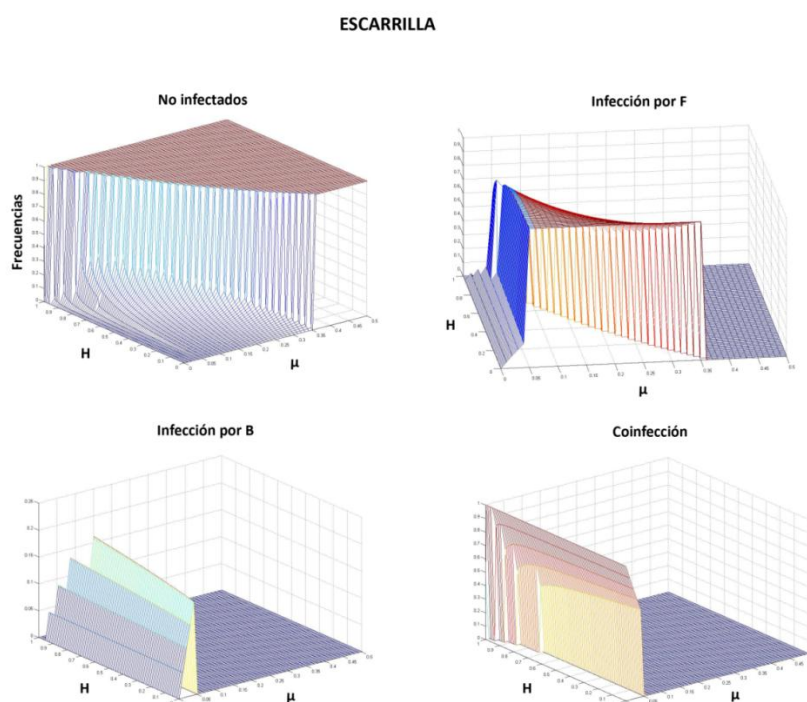


Fig. 17: Simulaciones matemáticas utilizando el modelo de dinámica de la infección sugerido por Vautrin *et al.* (2007), modificando la matriz  $M_{ci}$  acorde con los datos. Partiendo de unos valores de infección equivalentes a los de la población de Escarilla, se observa que para un rango amplio de parámetros, se mantendría la infección F (mayoritaria en los valores iniciales). Sólo valores muy altos de transmisión e incompatibilidad inducirían un incremento de los valores de coinfección, e infección por el supergrupo B. La extinción de la infección sólo se daría con valores muy bajos de incompatibilidad unidireccional, y con tasas bajas de transmisión.

Con el fin de inferir la estabilidad de los distintos patrones de infección a lo largo del tiempo, se realizaron simulaciones matemáticas utilizando el modelo propuesto por Vautrin *et al.* (2007) con las modificaciones comentadas en la sección de material y métodos respecto a la matriz  $M_{ci}$  (ver apartados “Modelización matemática”, pág. 70 y “Variación intra-generacional de la infección por *Wolbachia*”, pág. 128), pero sin incluir la variación intra-anual, que será valorada en la siguiente sección. Se utilizaron como referencia las frecuencias de infección medias de Escarrilla, Sallent y Arudy, dado que representaban puntos de partida muy diferentes: una población infectada principalmente por el supergrupo F; otra con altas tasas de coinfección, y en tercer lugar, una población con índices bajos de infección, mayoritariamente por el supergrupo B. A su vez, estas poblaciones podrían considerarse representativas de los patrones de infección descritos por Zabal-Aguirre *et al.* (2010), y que serán corroborados y discutidos por nuestros resultados más adelante.

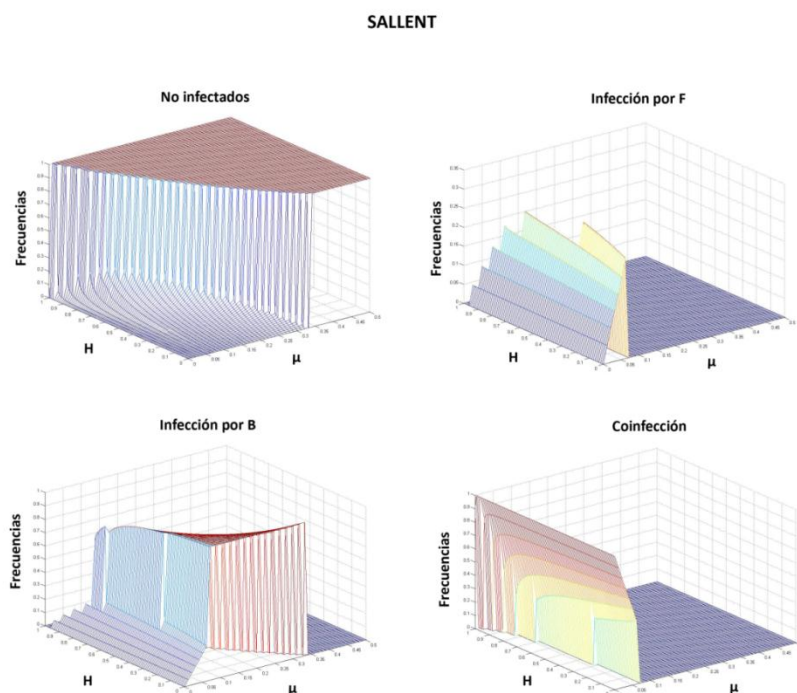


Fig. 18: Simulaciones matemáticas utilizando el modelo de dinámica de la infección sugerido por Vautrin *et al.* (2007), modificando la matriz  $M_{ci}$  acorde con los datos. Partiendo de unos valores de infección equivalentes a los de la población de Sallent, se observa que para un rango amplio de parámetros podría prosperar la infección por B, y que sólo valores altos de transmisión e incompatibilidad permitirían el mantenimiento de los actuales valores de coinfección. Esto hace sospechar de otro tipo de fuerzas evolutivas que estén actuando en esta población. La extinción de la la infección sólo se daría con valores muy bajos de incompatibilidad unidireccional, y con tasas bajas de transmisión.

A partir de estas frecuencias iniciales se obtuvieron las frecuencias de infección para cada tipo (no infectados, infectados por F, infectados por B y coinfectados) tras 4.000 generaciones (equilibrio estable), considerando valores de  $H$  que variaban de 0 a 1, y valores de  $\mu$  de 0 a 0,5. Estas simulaciones nos permitieron observar:

- (i) Las frecuencias de infección se estabilizan tras un número de generaciones relativamente bajo, menos de 500 generaciones en todos los casos.
- (ii) Los valores finales de estas simulaciones serán similares a los patrones actuales de infección para un rango de valores de  $H$  y  $\mu$  amplio. Esto nos permite proponer que el actual patrón de infección, salvo que otros factores entraran en juego, se mantendrá a lo largo del tiempo, a excepción de Sallent de Gállego, donde serían necesarias otro tipo de interacciones con el fin de mantener la actual infección. Estos datos deben considerarse preliminares.

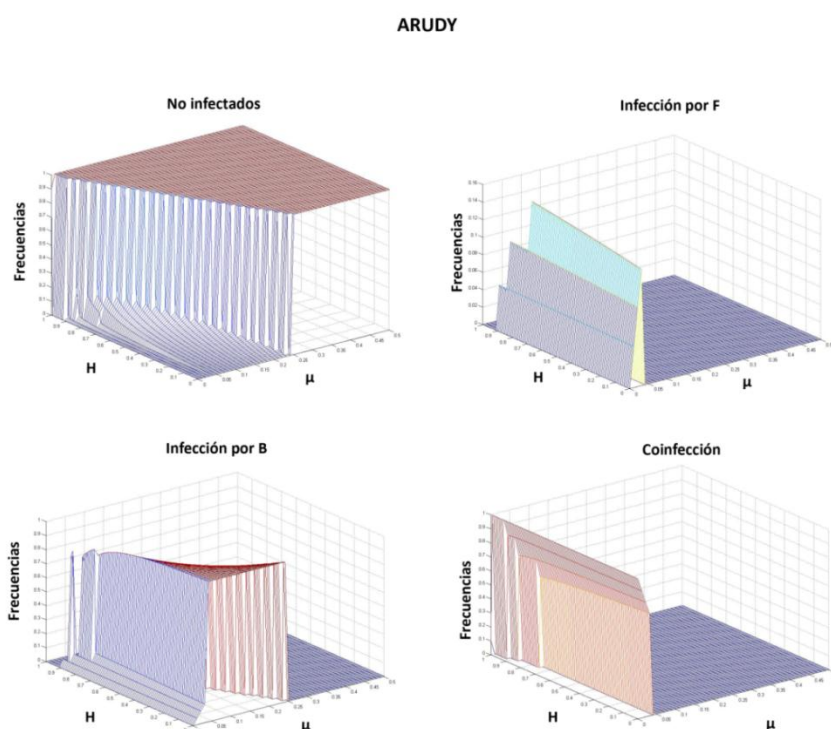


Fig. 19: Simulaciones matemáticas utilizando el modelo de dinámica de la infección sugerido por Vautrin *et al.* (2007), modificando la matriz  $M_{ci}$  acorde con los datos. Partiendo de unos valores de infección equivalentes a los de la población de Arudy, podemos observar que para un rango amplio de parámetros, podría prosperar la infección por B, incrementándose estos valores respecto a los valores actuales de la infección. La extinción de la infección sólo se daría con valores muy bajos de incompatibilidad unidireccional, y tasas bajas de transmisión. Aunque en esta ocasión los valores mínimos de transmisión son superiores.

### 26.3 Infección por *Wolbachia* a lo largo del transecto de la zona híbrida.

Tras analizar la variación de los niveles de infección en cada una de las poblaciones a lo largo de los años, se establecieron sus valores medios, y se compararon para cada tipo de infección a lo largo del transecto de la zona híbrida de *C. parallelus*. Es relevante el cambio drástico de las frecuencias de infección a lo largo del transecto, y que muestran una transición entre las frecuencias de infección características a ambos extremos de la zona híbrida (ver sección “Estructuración genética de las poblaciones”, pág. 121). En los siguientes gráficos se muestran las frecuencias medias de cada supergrupo, así como el caso de los individuos infectados y no infectados a lo largo del transecto de la ZH (Fig. 20 a 24).

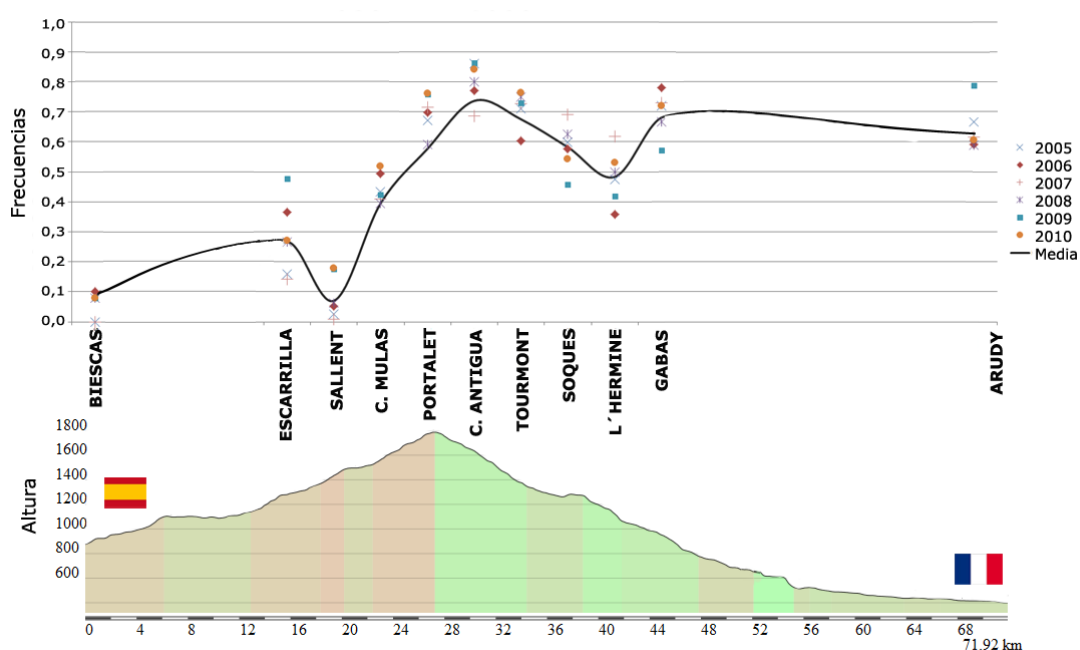


Fig. 20: Frecuencias relativas correspondientes a los individuos no infectados, en las distintas poblaciones analizadas a lo largo del transecto de la ZH. Los distintos puntos indican las frecuencias correspondientes a un año concreto. La línea indica los valores medios.



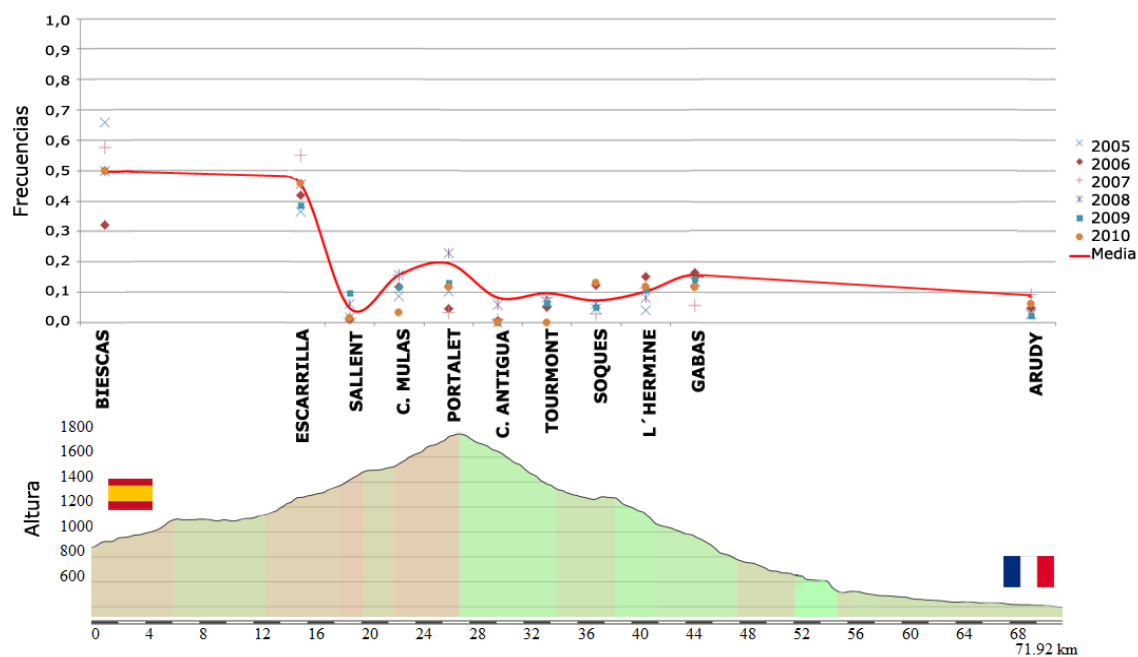


Fig. 21: Frecuencias relativas correspondientes a los individuos infectados por el supergrupo F, en las distintas poblaciones analizadas a lo largo del transecto de la ZH. Los distintos puntos indican las frecuencias correspondientes a un año concreto. La línea indica los valores medios.

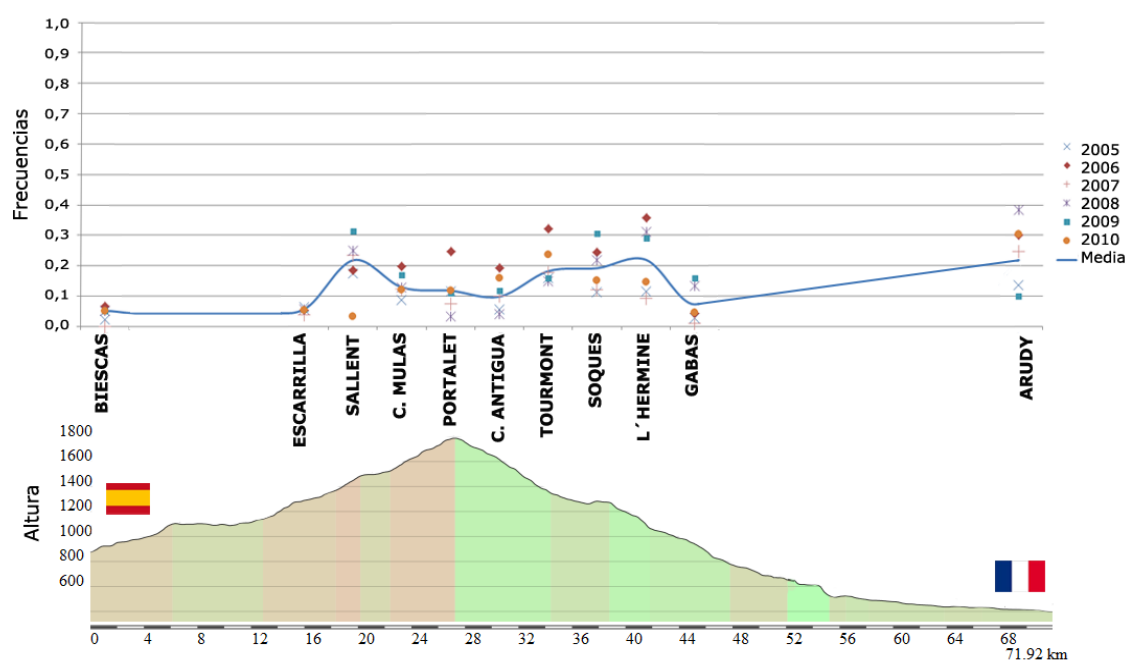


Fig. 22: Frecuencias relativas correspondientes a los individuos infectados por el supergrupo B, en las distintas poblaciones analizadas a lo largo del transecto de la ZH. Los distintos puntos indican las frecuencias correspondientes a un año concreto. La línea indica los valores medios.

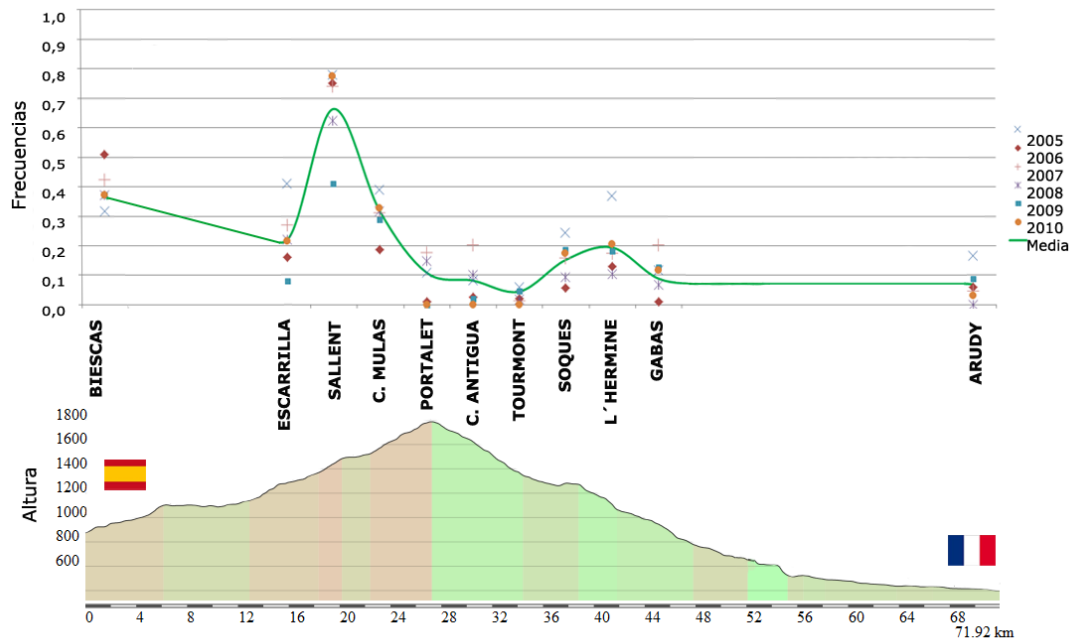


Fig. 23: Frecuencias relativas correspondientes a los individuos coinfectados por ambos supergrupos, en las distintas poblaciones analizadas a lo largo del transecto de la ZH. Los distintos puntos indican las frecuencias correspondientes a un año concreto. La línea indica los valores medios.

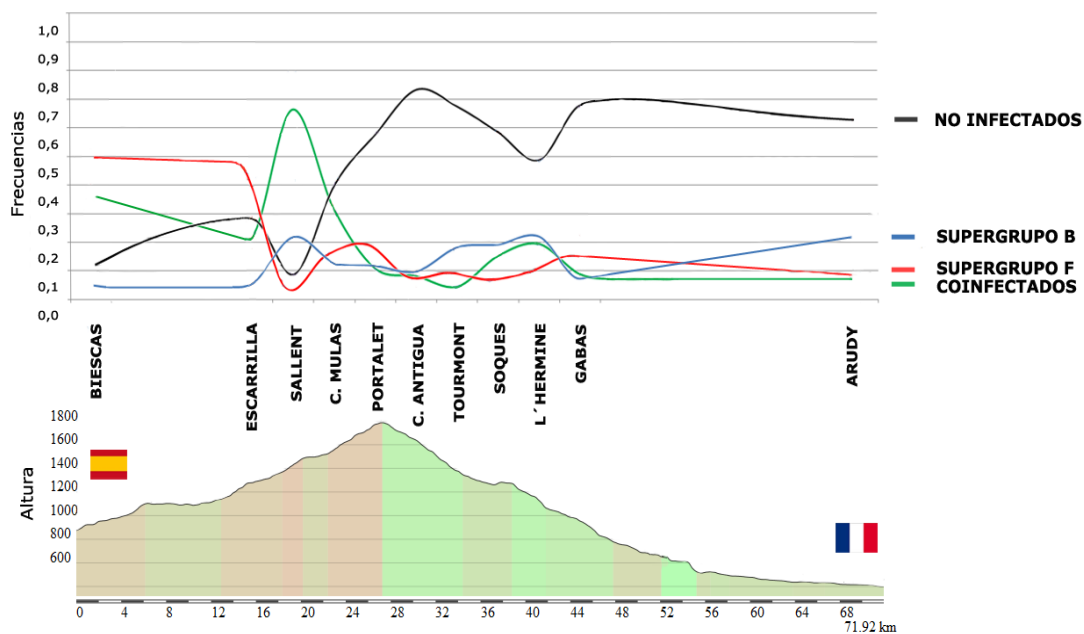


Fig. 24: Superposición de las distintas clinas. Se muestran los valores medios de las frecuencias de infección estimadas en cada una de las poblaciones en los distintos muestreos realizados.

## 26.4 Estructuración genética de las poblaciones.

El análisis de la infección por *Wolbachia* a lo largo de la zona híbrida, permite observar patrones muy diferentes en la infección por este endosimbionte que caracterizan a las distintas poblaciones (Fig. 25 y Fig. 26). En nuestro análisis se incluyeron poblaciones de la Península Ibérica, así como del Europa del Norte, Italia y Eslovenia. Este estudio a gran escala corrobora la existencia de patrones diferenciales de infección en ambas subespecies de *C. parallelus*.

Esta estructura queda reflejada en el análisis de conglomerados jerárquicos realizado a continuación (ver Fig. 27 y Fig. 28), siguiendo la metodología propuesta por Zabal-Aguirre *et al.* (2010), con modificaciones, y que permite la clasificación de las distintas poblaciones y muestreos seriados en 6 grupos o “clusters”. Observamos unos patrones diferenciados, mantenidos en el tiempo, para aquellas poblaciones cuyo análisis se lleva realizando en los últimos años.

Tras la construcción del dendograma, la asignación de los clusters se basó en la propiedad aditiva de los valores de G del “G-test”, que determina que  $G_{total} = G_{heterogeneity} + G_{pooled}$ , donde  $G_{total}$ , es el valor de G de todas las muestras consideradas independientemente,  $G_{pooled}$ , se corresponde con el valor de G entre los clusters, considerando cada cluster como una única población, y finalmente, la  $G_{heterogeneity}$ , es la suma de las tres G calculadas dentro de cada grupo (por ejemplo, dentro de los grupos). Esto nos permite calcular qué porcentaje de la variabilidad de la muestra viene explicada por la variación dentro de los grupos, y el porcentaje de dicha variabilidad explicada por la subdivisión de las muestras. Se establecerá el número de grupos K, como aquel que maximice el porcentaje de la varianza explicada por la división de las muestras en subgrupos (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010).

Dichos cálculos, apoyan la existencia de los 6 clusters: Considerando este número de subgrupos, el porcentaje de la variabilidad explicado por dicha subdivisión explica el 75% de la variabilidad ( $x=0,752$ ). Efectivamente en el dendograma resultante pueden observarse 6 grandes grupos que se corresponderían con los distintos 3 patrones de infección previamente descritos, así como 3 nuevos subgrupos, relacionados con los patrones previos:

Se puede distinguir el denominado previamente “Patrón del norte” (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Este patrón incluiría las poblaciones francesas y las poblaciones españolas del transecto de la zona híbrida hasta Corral de Mulas, y se caracterizaría por una baja infección, siendo ésta principalmente por el supergrupo B. Cabe destacar a las poblaciones de la cornisa cantábrica, que debido a la tipología de infección que presentan (bajos niveles de infección, provocada principalmente por el supergrupo B), se agrupan junto a las poblaciones francesas.

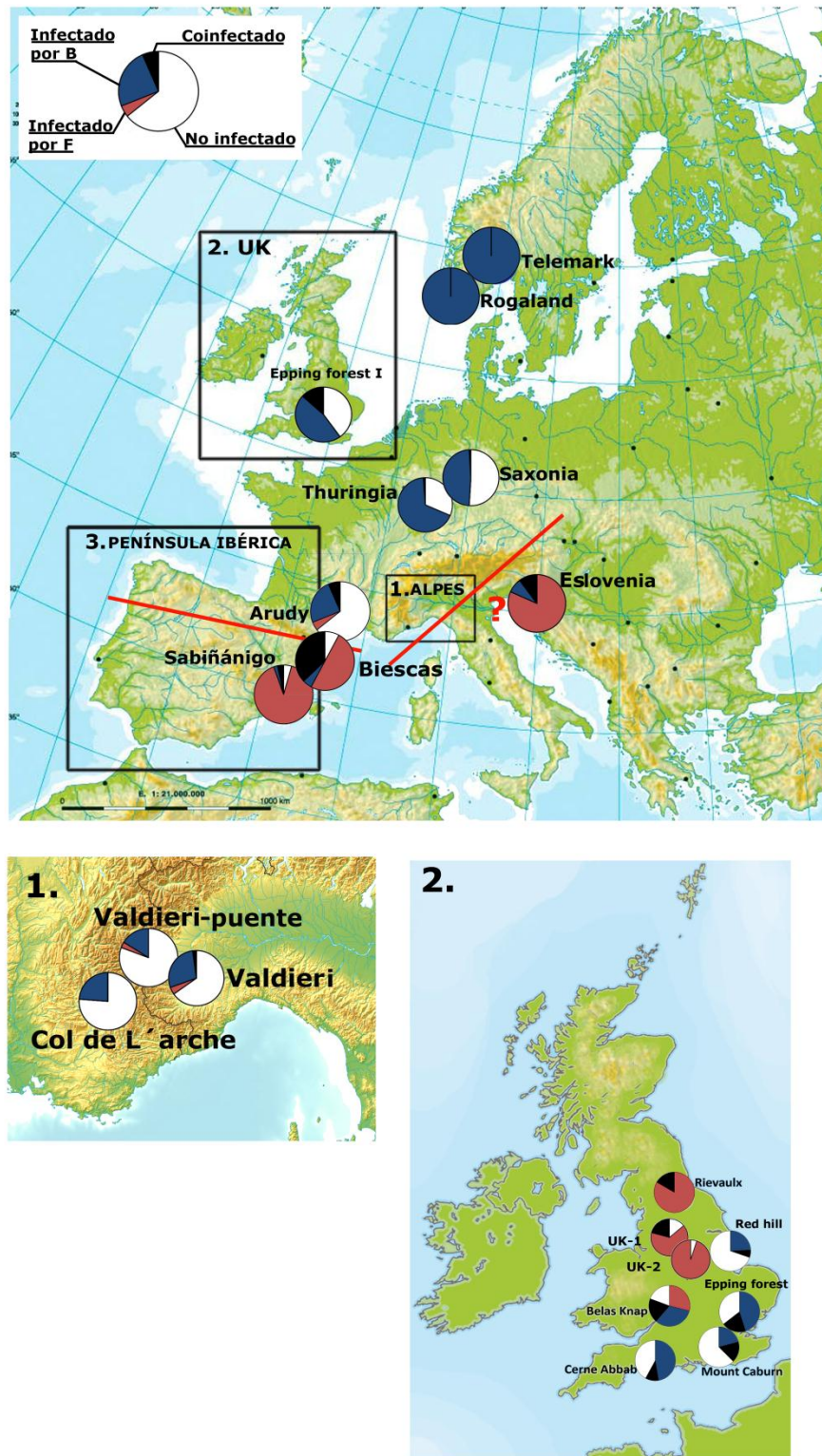


Fig. 25: Frecuencias relativas de infección en las distintas poblaciones analizadas. En los casos en los que una población haya sido muestreada en varios años sucesivos, se mostrará el valor medio de los muestreos. Los cuadrados indican zonas ampliadas en esta misma figura, o en la Fig. 26.

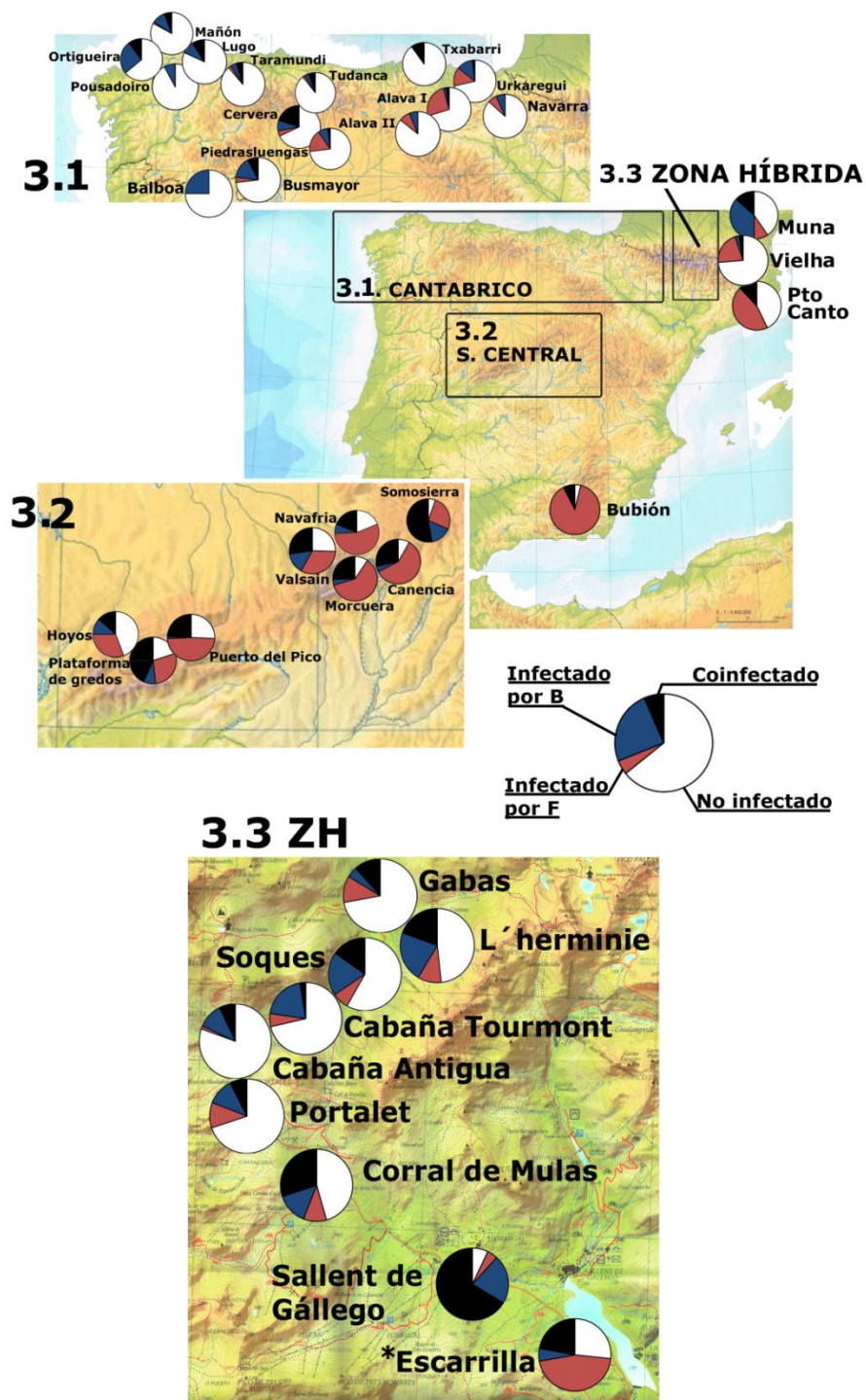


Fig. 26: Frecuencias relativas de infección en las distintas poblaciones analizadas. En los casos en los que una población haya sido muestreada en varios años sucesivos, se mostrará el valor medio de los muestreos. Los cuadrados numerados hacen referencia a las zonas ampliadas. A su vez, esta figura es complementaria de la Fig. 25. Todas las poblaciones presentan sobre el mapa una ubicación aproximada, en concreto la población de \*Escarrilla se encuentra más al sur de lo que indica la figura. Las coordenadas exactas de todas las poblaciones pueden consultarse en la Tabla B1 del anexo B.



Dentro de este “Patrón del norte”, pueden destacarse dos nuevos subgrupos. El primero comprende las poblaciones de Europa del Norte, infectadas únicamente por el supergrupo B en porcentajes cercanos al 100%. Además, se observa un nuevo subgrupo que incluiría las poblaciones de Saxonia y Thuringia, así como la población inglesa de Epping Forest con niveles de infección por B de alrededor del 50%. Estas poblaciones presentan altos índices de infección sin llegar a los niveles del 100% detectados en las poblaciones noruegas.

Por otro lado, se determina el patrón denominado previamente *Sallent de Gállego* por su correspondencia con esta población del transecto, y que se caracteriza por un incremento significativo de los individuos coinfectados. También se distingue el previamente nombrado como “Patrón del sur”, que incluiría las poblaciones españolas dentro de la zona híbrida (Escarrilla, Biescas...), así como la mayoría de las poblaciones de la Península Ibérica (a excepción de la cornisa Cantábrica), caracterizándose éstas por un predominio de la infección por el supergrupo F y niveles variables de coinfección. Por otro lado, existe evidencia estadística (ver “G-test”) para separar en un nuevo subgrupo las poblaciones de Bubión, Eslovenia y Sabiñánigo, al presentar rasgos propios, con altos niveles de infección por F, cercanos al 100%.

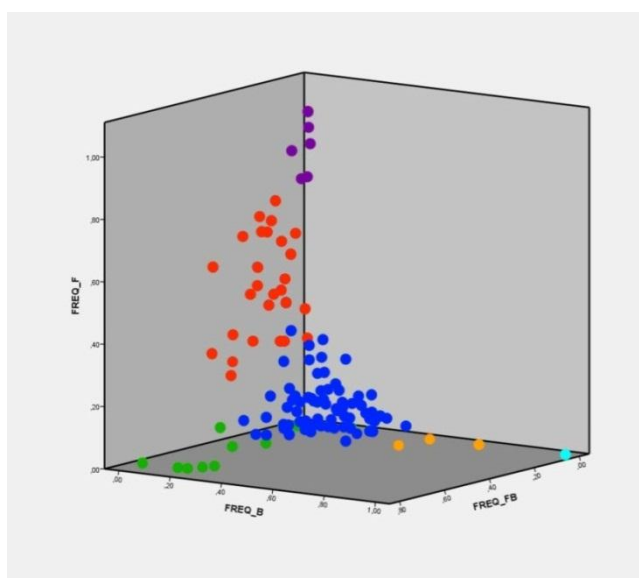


Fig. 27: Representación gráfica de las distintas poblaciones analizadas en función de sus frecuencias de infección para los supergrupos F, B, y sus frecuencias de coinfección. En azul se muestran las poblaciones del denominado “Patrón del norte”; en rojo, aquellas poblaciones pertenecientes al “Patrón del sur”; en verde, la población de Sallent de Gállego en sus sucesivos muestreos; en morado las poblaciones de Bubión, Eslovenia y Sabiñánigo; en naranja las Alemanas, y en azul celeste, las poblaciones noruegas.

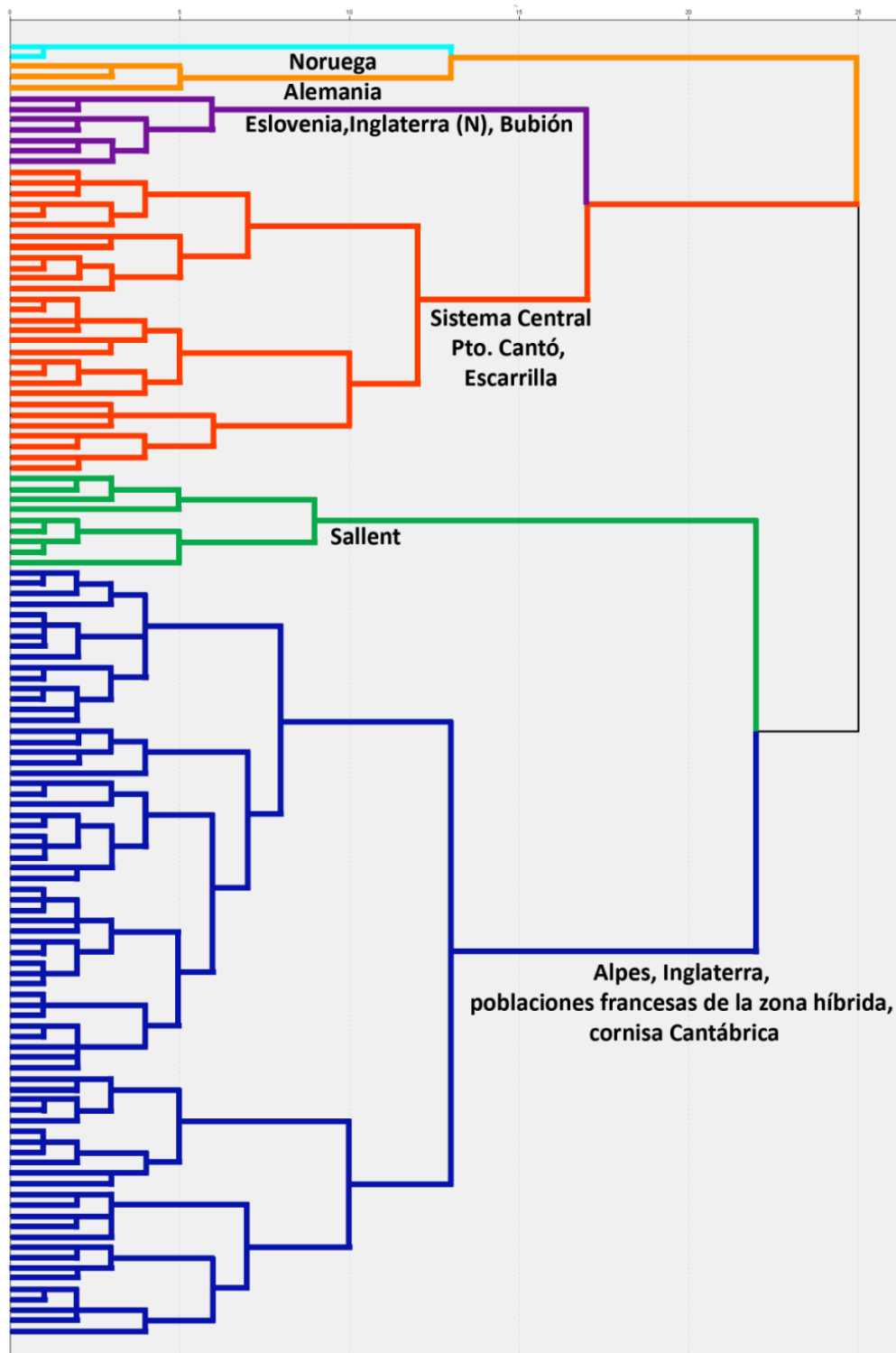


Fig. 28: Dendrograma resultante del an6lisis de conglomerados jer6rquicos. La confirmaci6n de los 6 grupos descritos, y a los que se les ha asignado colores distintos, se ha realizado acorde con el an6lisis de los valores relativos de G.

Se han analizado las diferencias entre las frecuencias medias de infección entre los distintos grupos mediante un test de varianza no paramétrico. Para ello se ha realizado un Test *Kruskal-Wallis* para cada una de las categorías. En todos los casos, se observaron diferencias significativas entre los *clusters* (No infectados:  $H=6900,689$ , g.l.=5,  $p\approx 0,000$ ; Infectados por F:  $H=6282,539$ , g.l.=5,  $p\approx 0,000$ ; Infectados por B:  $H=3831,933$ , g.l.=5,  $p\approx 0,000$ ; Coinfectados:  $H=5299,720$ , g.l.=5,  $p\approx 0,000$ ).

Por otro lado, se ha estudiado el grado de fragmentación poblacional mediante un test de AMOVA utilizando el software *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005). Este software permite testar la estructuración genética través de la comparación de los resultados de distintas agrupaciones elegidas por el investigador, eligiéndose aquella que maximice la varianza entre grupos. Esta aproximación es conceptualmente muy similar a la planteada anteriormente, por la cual se testaba qué número de clados explica mejor la variabilidad observada, utilizando en ese caso la propiedad aditiva del “G-test”. El test AMOVA, implementado en *ARLEQUIN*, está diseñado para valorar el grado de fragmentación poblacional utilizando distintos tipos de datos genéticos, por ejemplo, las frecuencias de los distintos genotipos en las poblaciones analizadas. En nuestro caso, no disponemos de ese tipo de datos, puesto que estamos analizando las frecuencias de los distintos “tipos de infección”, por lo que esta aproximación debe tomarse con precaución. Sin embargo, consideramos que esta adaptación, si bien cuestionable, puede resultar útil para valorar la fragmentación poblacional de la infección.

Este test permite analizar la estructuración de las muestras en tres niveles, reflejados en los índices de fijación:

- (i)  $F_{SC}$ , que refleja la variación debida a la subdivisión poblacional dentro de un grupo.
- (ii)  $F_{ST}$ , que nos indica la variabilidad debida a la diferenciación dentro de las subpoblaciones de la muestra total.
- (iii)  $F_{CT}$ , que refleja el grado de variación consecuencia de la estructuración de la población total en grupos.

Para ello se establecen tres componentes de la varianza, denominadas  $V_a$ ,  $V_b$  y  $V_c$ , afectando  $V_a$  a todo el grupo,  $V_b$  a las poblaciones dentro de un grupo, y  $V_c$  a los individuos dentro de una población. Los componentes de la varianza de cada nivel jerárquico se calculan igualando las desviaciones de las sumas de cuadrados observadas, a sus valores esperados. A su vez, los niveles de significación estadística se calculan mediante permutaciones de la varianza y de los distintos estadísticos.



Estableciéndose *a priori* los distintos grupos hipotetizados anteriormente en el análisis jerárquico de conglomerados,  $K=6$ , así como sus hipótesis alternativas ( $K=1, 2, 3, \dots, i$ ), podemos establecer para qué valor de  $K$ , se obtiene un mayor nivel de estructuración. Para ello se obtuvieron los índices de fijación  $F_{SC}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{CT}$ . En este caso (Tabla 4), se obtuvo un valor máximo para el estadístico  $F_{CT}$ : 0,331, y un valor de  $F_{ST}$ : 0,365 con un  $p$ -valor  $\approx 0,000$ , para un valor de  $K=6$ , que refleja la estructura propuesta por el dendograma. Este estadístico nos indica el grado de estructuración poblacional más plausible que existe en nuestras muestras. El valor obtenido fue mayor al esperado por azar y nos permite afirmar con evidencia estadística, que las muestras están subdivididas en estos 6 subgrupos, con características similares dentro de cada uno de ellos.

Por otro lado, las poblaciones muestreadas presentan un evidente gradiente respecto a sus frecuencias de infección, observándose que, aparentemente, existe una relación entre la localización geográfica de las muestras y sus características respecto a la infección por *Wolbachia*. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un test de Mantel, para comprobar si existe una mayor diferenciación de las poblaciones respecto a su infección, cuando dichas poblaciones son más distantes geográficamente.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	5	727.380	0.13409 Va	33.10
Entre poblaciones, dentro de los grupos	45	98.841	0.01363 Vb	3.36
Entre las poblaciones	8539	2.197.594	0.25736 Vc	63.53
Total	8589	3.023.815	0.40507	
Indices de fijación			p-valor	
FSC	0.05029		0.000	
FST	0.36466		0.000	
FCT	0.33102		0.000	

Tabla 4: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) realizado a partir de las frecuencias de cada tipo de infección en las distintas poblaciones de *C. parallelus*.

El test de Mantel calculará la correlación entre dos matrices, la primera recogerá las distancias euclídeas al cuadrado entre las distintas poblaciones muestreadas. La segunda matriz, recoge la distancia geográfica entre poblaciones (obtenida a partir de sus coordenadas geográficas mediante el software *Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3*). De este modo permite evaluar si las poblaciones más distantes tienen características diferentes en relación al tipo de infección.

Dicho análisis, resultó en un índice de correlación  $r=0,520$ , cuyo  $p\text{-valor}\approx 0.000$ . Este resultado respalda la observación empírica apuntada previamente, y permite establecer un patrón geográfico en relación a las frecuencias de infección. De nuevo, debe considerarse con precaución, teniendo en cuenta que este análisis supone una adaptación del Test de Mantel implementado en *ARLEQUIN*, en el que se han utilizado a modo de datos las frecuencias de infección, frente a las frecuencias genotípicas, típicamente empleadas en este test.

## **27 VARIACIÓN INTRA-GENERACIONAL DE LA INFECCIÓN POR *WOLBACHIA*.**

Como parte del estudio de la dinámica de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*, se investigó la variación intra-anual de las frecuencias de infección a lo largo del ciclo de vida de este ortóptero. Para ello se analizaron las frecuencias de infección a lo largo del verano en dos poblaciones de *C. parallelus*: Navafría y Sallent de Gállego. Este estudio permitió comprobar que en la población de Navafría existían variaciones en las frecuencias de coinfección de los machos. Este análisis, planteó la posibilidad de que un descenso en las frecuencias de coinfección (ver sección “Variación intra-generacional de la infección por *Wolbachia*”, pág. 128) pudiera alterar la evolución de las frecuencias a largo plazo, y afectar así a la transmisión o a los niveles de incompatibilidad de la bacteria a lo largo del tiempo. Para ello, se simuló el cambio en las frecuencias de infección en función de distintos parámetros.

### **27.1 Diferencias en la infección entre poblaciones.**

Para este análisis se muestrearon 2 poblaciones previamente bien caracterizadas: Las de Navafría y Sallent de Gállego, que están altamente infectadas por *Wolbachia*, tal y como se describe en las Tablas B3 y B4 del anexo B, donde se recoge la detección de la infección mediante amplificación por PCR del gen *16S rRNA* de esta bacteria. De forma global, no hay



diferencias significativas ( $p > 0.01$ ) en el nivel de infección entre hembras y machos (NAV (2005):  $G = 8,977$ , g.l. = 3;  $p = 0.030$  / SAL(2007):  $G = 6,057$ , g.l. = 3;  $p = 0,109$ ). Los datos globales pueden consultarse en la Tabla 5.

Población (año)	n	Inf B	Inf F	Inf FB	No infectado
NAV (2005)	283	0,64±0,06	0,10±0,04	0,22±0,05	0,04±0,02
SAL (2007)	321	0,02 ±0,02	0,23±0,05	0,73±0,05	0,02±0,02

Tabla 5: Frecuencias de infección ( $\pm 2$  veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (Wilson, 1927)) en las poblaciones de NAV y SAL, acumulando los datos correspondientes a los tres muestreos intra-anales, independientemente del sexo de los individuos.

Por otro lado, se han estimado las frecuencias de infección de los distintos supergrupos para los muestreos intra-anales de forma individual, considerándose a su vez el sexo de los individuos analizados. Los datos detallados se muestran en las Tablas B3 y B4 del anexo B. Las frecuencias obtenidas en este estudio parcial son consistentes con las frecuencias descritas en estas mismas poblaciones en años anteriores (Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010), así como las descritas en el apartado previo.

La secuenciación y el análisis filogenético obtenido a partir del gen *16S rRNA*, los 5 *loci* del MLST, y del gen *wsp*, muestran identidad para varias de las cepas bacterianas presentes en Navafría y Sallent de Gállego (Fig. A1 y A2 del anexo A). Para más detalles de este análisis consultar la sección “Filogenia y filogeografía de *Wolbachia*”, pág. 138. Análisis posteriores han permitido comprobar que en la población de Sallent de Gállego pueden aparecer de forma esporádica otras cepas del supergrupo F, filogenéticamente muy cercanas. Uno de los objetivos de este trabajo es analizar por qué, pese a que hospedador y endosimbiontes son extremadamente similares, las frecuencias de infección varían tanto en ambas poblaciones.

## 27.2 Variación intra-generacional de la infección por *Wolbachia*.

El análisis de la infección por *Wolbachia* en la población pirenaica de Sallent de Gállego demostró que no existen diferencias significativas en los niveles de infección a lo largo del verano ( $p > 0,01$ ). Las frecuencias de infección permanecen constantes a lo largo del verano, tanto en hembras como en machos (Total:  $G = 10,874$ , g.l.=6;  $p = 0,092$  / Hembras:  $G = 12,146$ , g.l.= 6;  $p = 0,059$  / machos:  $G = 11,980$ , g.l.=6;  $p = 0,062$ ).

Sin embargo, el análisis de los muestreos intra anuales en la población de Navafría demostró que los niveles de infección disminuían a lo largo del verano (Total:  $G=30,510$ , g.l.=6;  $p\approx 0,000$  / Hembras:  $G=6,267$ , g.l.=6;  $p=0,394$  / Machos:  $G=31,911$ , g.l.=6;  $p\approx 0,000$ ). El análisis de los residuos ajustados indicaba una disminución en las frecuencias de coinfección de los machos, así como un incremento asociado de las proporciones de machos no infectados (Fig. 29). No se observó una variación significativa en el caso de las hembras ( $p>0.01$ ) (Fig. 30).

### **27.3 Factores medioambientales: comparación entre las temperaturas en ambas poblaciones.**

Una de las posibilidades que se valoran en este trabajo es la implicación de factores ambientales en los niveles de infección. Esta hipótesis se basa en la observación de diferencias en las frecuencias de infección entre poblaciones que difieren en ciertas características climáticas, como por ejemplo la temperatura, así como a la evidencia de que *Wolbachia* es una bacteria termosensible. De hecho, en numerosos estudios se emplean choques térmicos de entre 30°C y 37°C para eliminarla (Clancy & Hoffmann, 1998; Van Opijnen & Breeuwer, 1999; Wiwatanaratnabutr & Kittayapong, 2006). A su vez, existen datos que sugieren una activación del sistema inmune de los acrididos, como *Chorthippus parallelus*, como consecuencia de las altas temperaturas (Ouedraogo *et al.*, 2003; Springate & Thomas, 2005). Es por ello que este factor será discutido como posible causa de las variaciones observadas.

La temperatura media para julio y agosto, difiere entre la población pirenaica de Sallent de Gállego y la de Navafría, en el Sistema Central. Sin embargo, las temperaturas correspondientes al mes de septiembre son similares (Fig. 31).

La temperatura de Navafría frecuentemente excede de los 30°C durante los meses de julio y agosto, y ocasionalmente, supera los 35°C. Estas altas temperaturas coinciden con la disminución paulatina de la infección en esta población. Por el contrario, las temperaturas de Sallent de Gállego, son significativamente más bajas (ANOVA: Datos globales:  $F = 55,23$ ; g.l. = 1, 152;  $p \approx 0,000$ . Julio:  $F=26,608$ ; g.l.=1, 60;  $p\approx 0,000$ . Agosto:  $F=62,840$ ; g.l. =1, 60;  $p\approx 0,000$ . Septiembre:  $F=0.496$ ; g.l.=1, 28;  $p=0,487$ ) variando entre los 20°C y los 25°C. Como hemos comentado con anterioridad, las frecuencias de infección en esta población pirenaica se mantienen estables a lo largo del verano.



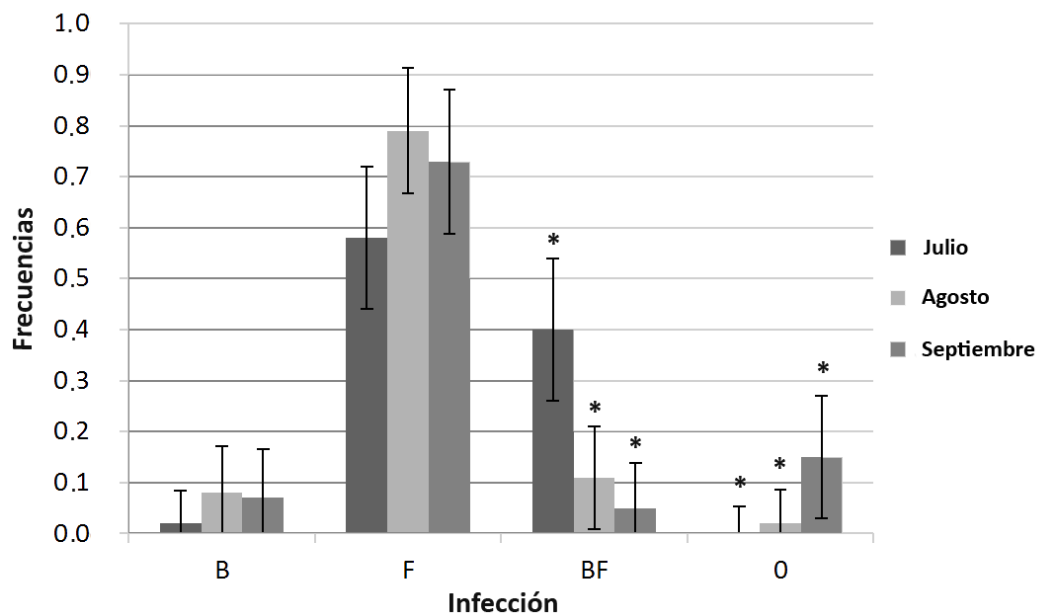


Fig. 29: Frecuencias de infección en machos de *Chorthippus parallelus* en la población de Navafría. Las barras de error representan 2 veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (Wilson, 1927).

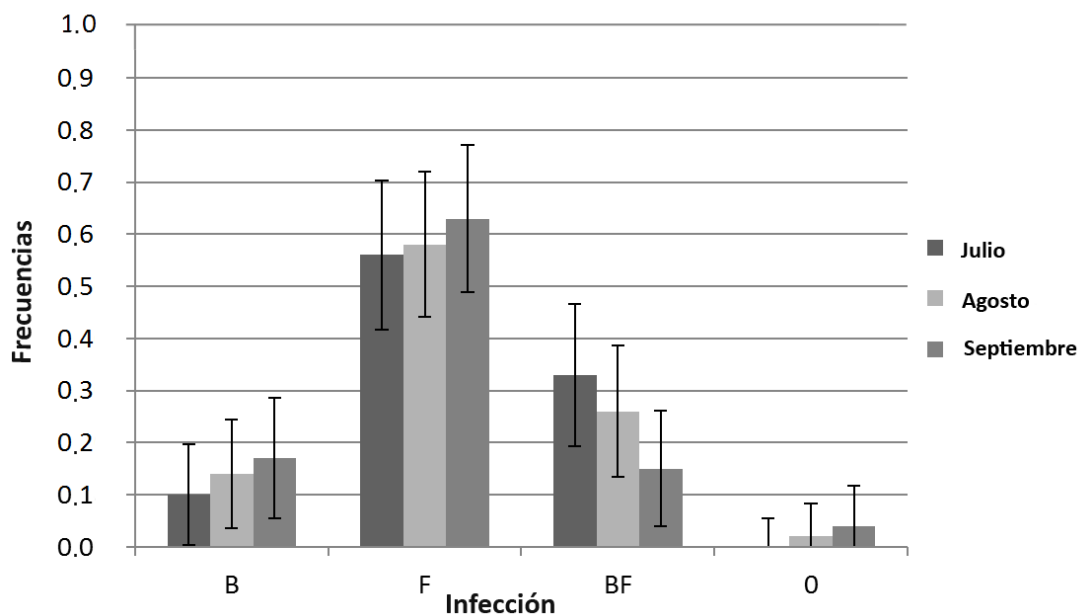


Fig. 30: Frecuencias de infección en hembras de *Chorthippus parallelus* en la población de Navafría. Las barras de error representan 2 veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (Wilson, 1927).

## 27.4 Efecto de la variación de las frecuencias de infección en la dinámica de la infección. Modelización matemática.

Tras la detección del descenso de los niveles de coinfección en los machos a lo largo de su desarrollo en ciertas poblaciones, e independientemente de su causa, nos hemos planteado cómo afectaría este proceso a la dinámica de la infección a largo plazo.

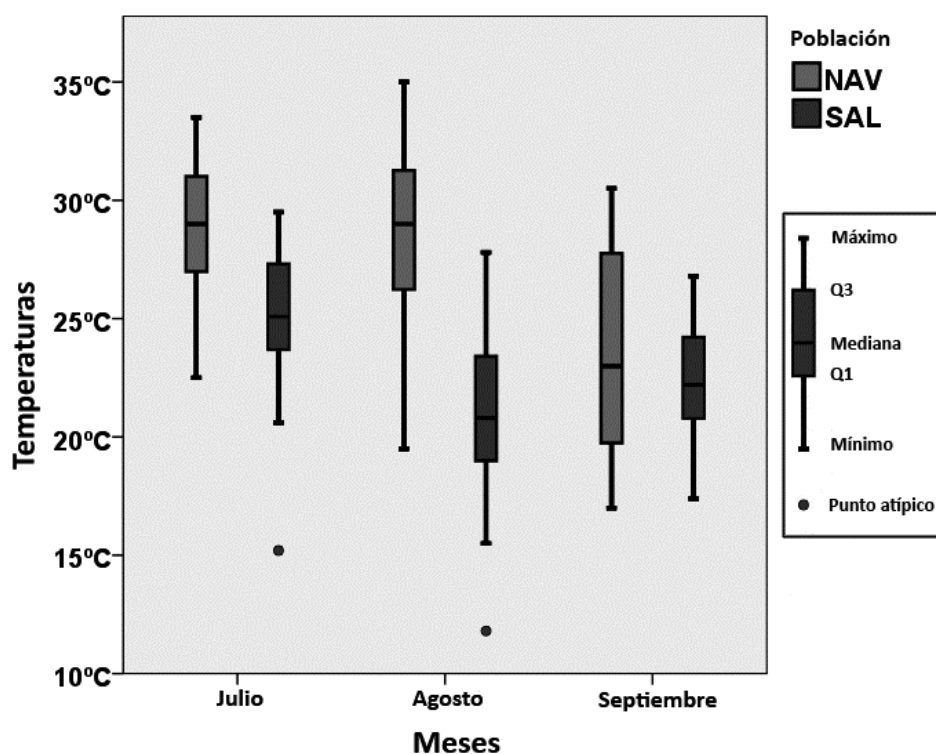


Fig. 31: Diagrama de cajas indicando el valor mínimo, los cuartiles Q1, Q2 o mediana, el Q3, el máximo. La caja indica el rango inter-cuartílico de las temperaturas correspondientes a los meses de julio, agosto y septiembre en ambas poblaciones. Los círculos indican los puntos atípicos, definidos como observaciones que son “numéricamente distantes del resto de los datos” en el sentido que superan la media  $\pm 3S$ .

## 27.5 Evolución de la infección por una única cepa.

En primer lugar, se han analizado las predicciones de los modelos Tullerianos, considerando una única cepa de *Wolbachia*. Este modelo y sus derivados, predicen la evolución de las frecuencias de infección en una población en función de tres parámetros básicos, la tasa de transmisión de la bacteria de las hembras a su descendencia, la incompatibilidad

citoplasmática inducida, y la fecundidad de las hembras infectadas en comparación con las hembras no infectadas (Turelli, 1994).

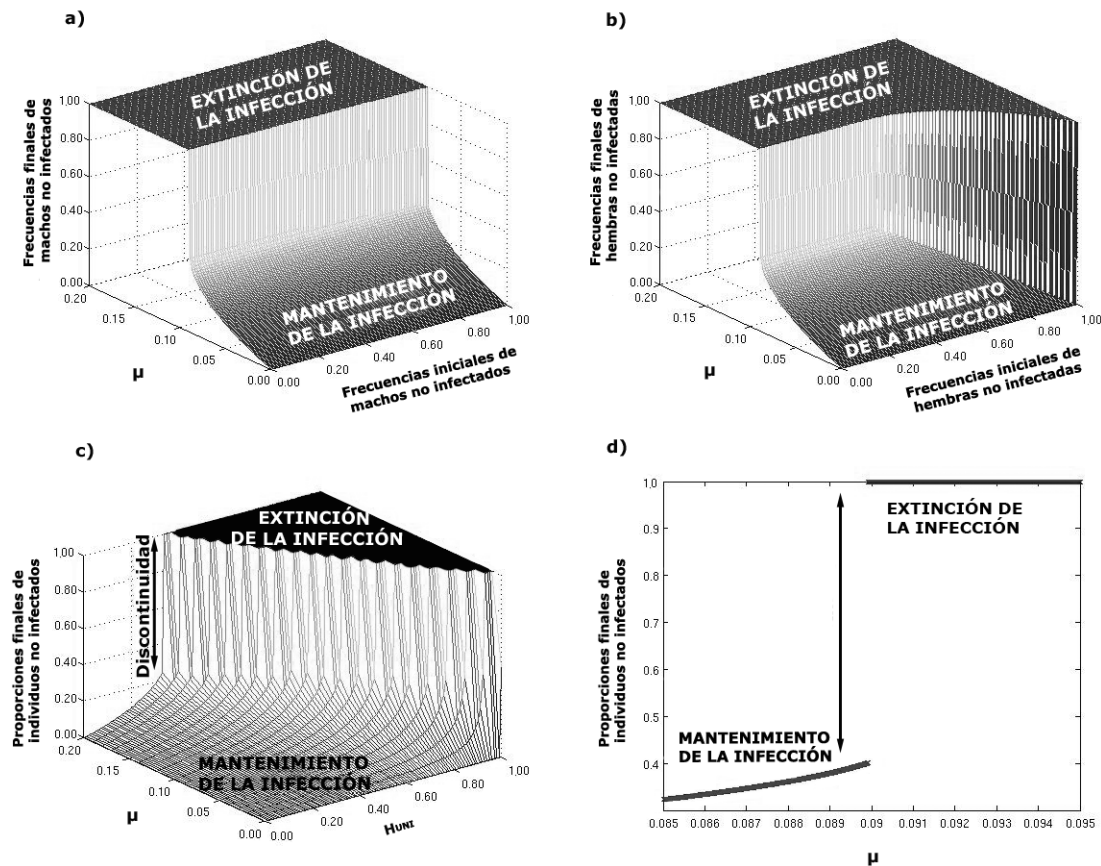


Fig. 32: Evolución de la infección por una única cepa de *Wolbachia* en *C. parallelus*. 32a) Evolución de las frecuencias de los machos no infectados tras 4.000 generaciones (equilibrio estable), en función de las frecuencias iniciales de machos no infectados. Las frecuencias iniciales de infección en las hembras fue 0,5 en esta simulación concreta ( $P_{fo}=0,5$ ). No se observan cambios notables si se varía este dato. 32b) Evolución de las frecuencias de las hembras no infectadas tras 4.000 generaciones (equilibrio estable), en función de las frecuencias iniciales de hembras no infectadas. Las frecuencias iniciales de infección en los machos fue también ( $P_{mo}=0,5$ ). 32c) y 32d) Discontinuidad en la predicción de las frecuencias de infección. Esta discontinuidad es independiente de las frecuencias iniciales. Esto implica que no existirán poblaciones estables, con frecuencias de infección (por una única cepa) inferiores al 60%.

Asumiendo que machos y hembras pueden estar infectados circunstancialmente en distinto grado por *Wolbachia*, como muestran los datos experimentales en *C. parallelus*, y que la evolución de las frecuencias de infección dependerá de los niveles de incompatibilidad citoplasmática unidireccional, de las tasas de transmisión y de la fecundidad de las hembras infectadas respecto a las no infectadas, hemos podido establecer diferencias en la dinámica de machos y hembras.

La figura 32a muestra la evolución de la frecuencia de los machos no infectados tras 4.000 generaciones (equilibrio estable), en función de la frecuencia de infección y la tasa de transmisión. La frecuencia inicial de las hembras fue fijada en  $P_{fo}=0,5$ . Por su parte, la figura 32b muestra la evolución de la frecuencia de las hembras no infectadas tras 4.000 generaciones (equilibrio estable), en función de la frecuencias de infección y la tasa de transmisión. La frecuencia inicial de los machos no infectados fue fijada en  $P_{mo}=0,5$ .

Las simulaciones muestran que la expansión y mantenimiento de la infección depende de las frecuencias iniciales de infección, dadas unas tasas de transmisión y unos niveles de incompatibilidad fijos. Estas predicciones están de acuerdo con estudios previos, que muestran la existencia de un umbral en las frecuencias de infección necesario para la expansión de la infección (Turelli, 1994; Frank, 1998; Vautrin *et al.*, 2007). Sin embargo, este umbral sólo se observa en las hembras. Las simulaciones muestran que en los machos, la evolución de sus frecuencias no depende de sus frecuencias iniciales.

Las frecuencias finales de infección, y por tanto el mantenimiento o desaparición de la infección, para unas frecuencias iniciales fijas, depende de la tasa de transmisión,  $\mu$ , y de la incompatibilidad unidireccional,  $H$  (ver definición en Tabla 3, pág. 71) (Turelli, 1994). En el caso de *C. parallelus*, donde la incompatibilidad citoplasmática se ha estimado en  $H_{UNI}=0,67$  (Zabal-Aguirre *et al.*, com. pers; Bella *et al.*, 2010), superado el umbral de infección para las hembras, la infección prosperaría incluso si la infección de los machos fuera mínima.

Por otro lado, las simulaciones permiten observar una discontinuidad en las frecuencias finales (estables) de la infección. Esta discontinuidad no depende de las frecuencias iniciales. Su dependencia con  $H$  y  $\mu$  se puede observar en la figura 32c, en la cual para una frecuencia fija de  $P_{mo}=P_{fo}=0,5$ , el rango de frecuencias “no alcanzables” varía en función de los valores de estos dos parámetros. En la figura 32d puede observarse con más detalle este fenómeno para valores fijos de  $H$ .

Esta discontinuidad, que aparece para cualquier valor de  $H$ , sugiere que para que una población infectada por una única cepa presente una infección estable, al menos un 60% de los individuos deberían estar infectados. Estos datos son coherentes con lo observado experimentalmente en algunas poblaciones de *C. parallelus* en las que sólo se ha detectado infección por el supergrupo F, si bien existen discrepancias en otras poblaciones. Hay casos en los que se ha observado una infección por el supergrupo B, por debajo de este 60%. Esto podría explicarse si estas poblaciones (i) no se encontraran en equilibrio, por ejemplo, si su infección fuese reciente, o (ii) porque la existencia de más de una cepa implique cambios en la dinámica de la infección.



Dado que la infección por una única cepa de *Wolbachia* es un fenómeno raro en *C. parallelus*, nuestro estudio se ocupa también del análisis de la evolución de las frecuencias de infección en el caso de la multi-infección.

## **27.6 Evolución de la doble infección.**

Para analizar la evolución de las frecuencias considerando dos cepas diferentes de *Wolbachia*, se han desarrollado dos modelos, restringido y relajado, que a su vez incorporan, o no, la variación intrageneracional observada (ver sección “Modelización matemática”, pág. 70)

Hemos explorado la evolución de la doble infección respecto a la fecundidad, la tasa de transmisión y el nivel de incompatibilidad citoplasmática en nuestra especie modelo, cuando ésta se encuentra infectada por dos cepas de *Wolbachia*.

Nos hemos centrado en estudiar el equilibrio estable de las frecuencias de infección en una población que, en cuanto a sus frecuencias, fuese equivalente a la actual población de Navarra, con el fin de predecir la evolución de sus frecuencias de infección.

Varios estudios predicen un incremento paulatino de las frecuencias de coinfección, dada la ventaja evolutiva, dependiente de frecuencias, que tendrían las hembras infectadas por todas las cepas presentes en una población (Turelli, 1994; Frank, 1998). Sin embargo, este incremento de los niveles de coinfección no se observa en un gran número de poblaciones de la Península Ibérica, entre otras, la población de Navarra.

### **27.6.1 Modelo restrictivo y relajado sin variación intrageneracional.**

Las simulaciones se resumen en la Fig. 33. En ellas se refleja la situación en el equilibrio de la población (después de 4.000 generaciones), entendiéndose por ello qué tipo de infección prevalece sobre el resto. Esto es: infección por F, infección por B, coinfección o pérdida de la infección, siempre existiendo frecuencias variables del resto de tipos.

*Modelo restrictivo: la cepa F no rescata las modificaciones de la cepa B, y viceversa.*

A partir de las frecuencias iniciales detectadas en la población de Navarra y bajo las asunciones del modelo restrictivo, encontramos 2 equilibrios principales, el incremento de los valores de coinfección, o bien la desaparición de la infección. Un tercer equilibrio, en el que sería



la cepa F la que prosperase hasta ser la más abundante en la población, sería alcanzable en un estrecho rango de parámetros (Fig. 33).

Las simulaciones llevadas a cabo considerando el modelo restrictivo, suponen el mantenimiento de altas tasas de coinfección, incluso si el nivel de incompatibilidad que afectara a los cruzamientos fuera bajo, mientras se mantengan niveles altos de transmisión. A su vez, se observa que si se parte de frecuencias de infección comparables a las detectadas en la población de Navafría y un valor de  $H_{UNI}=0.67$  (Zabal-Aguirre, comunicación personal; Bella *et al.*, 2010), se requieren tasas de transmisión  $\mu_F = \mu_B < 0.04$  para garantizar una expansión de la coinfección en la población. A su vez, cuando  $\mu$  y el nivel de incompatibilidad son bajos, el modelo predice la extinción total de la infección.

Las simulaciones muestran que el mantenimiento de la infección por la cepa F requiere de un rango estrecho de parámetros. A su vez, este rango está fuera del valor de  $H_{UNI}$  detectado en *C. parallelus*. Estos resultados contrastan con los datos experimentales de los que disponemos, en los cuales puede observarse que la infección por el supergrupo F es relativamente frecuente en las poblaciones de la Península Ibérica.

*Modelo relajado: cepa F rescata parcialmente las modificaciones de la cepa B, y viceversa.*

Las simulaciones muestran los tres estados de equilibrio descritos en el modelo anterior, sin bien el rango de valores para los parámetros  $H$  y  $\mu$  que permitiría el mantenimiento de la infección mayoritaria por la cepa F, es mayor (Fig. 33).

Las simulaciones llevadas a cabo asumiendo un valor  $H_{UNI}=0.67$  sugieren que el mantenimiento de la infección por la cepa F en una población cuyas frecuencias fueran equivalentes a las de la población de Navafría, depende directamente de las tasas de transmisión, de tal modo que incluso con valores bajos de incompatibilidad, se puede alcanzar este equilibrio para valores de  $\mu > 0.05$ .

Tal y como se esperaba, bajos niveles de incompatibilidad junto con altas tasas de transmisión dirigen a la infección a la extinción. A su vez, unos niveles altos de incompatibilidad, de forma conjunta con altos niveles de transmisión, permiten la prevalencia de la coinfección.

## **27.6.2 Modelos restrictivo y relajado, incorporando la variación intrageneracional.**

Nuestros datos experimentales de la población de Cpe de Navafría (Sistema Central) describen una disminución de los niveles de coinfección a lo largo del ciclo biológico de *C. parallelus*. Debido a ello, las probabilidades de cada tipo de cruzamiento, incluyendo los cruzamientos parcialmente incompatibles, variará en función del momento del verano en el que se produzca el apareamiento. Este hecho puede tener consecuencias en la dinámica de la infección. Para apoyar o descartar esta hipótesis, se ha incluido este parámetro en los modelos previamente descritos.

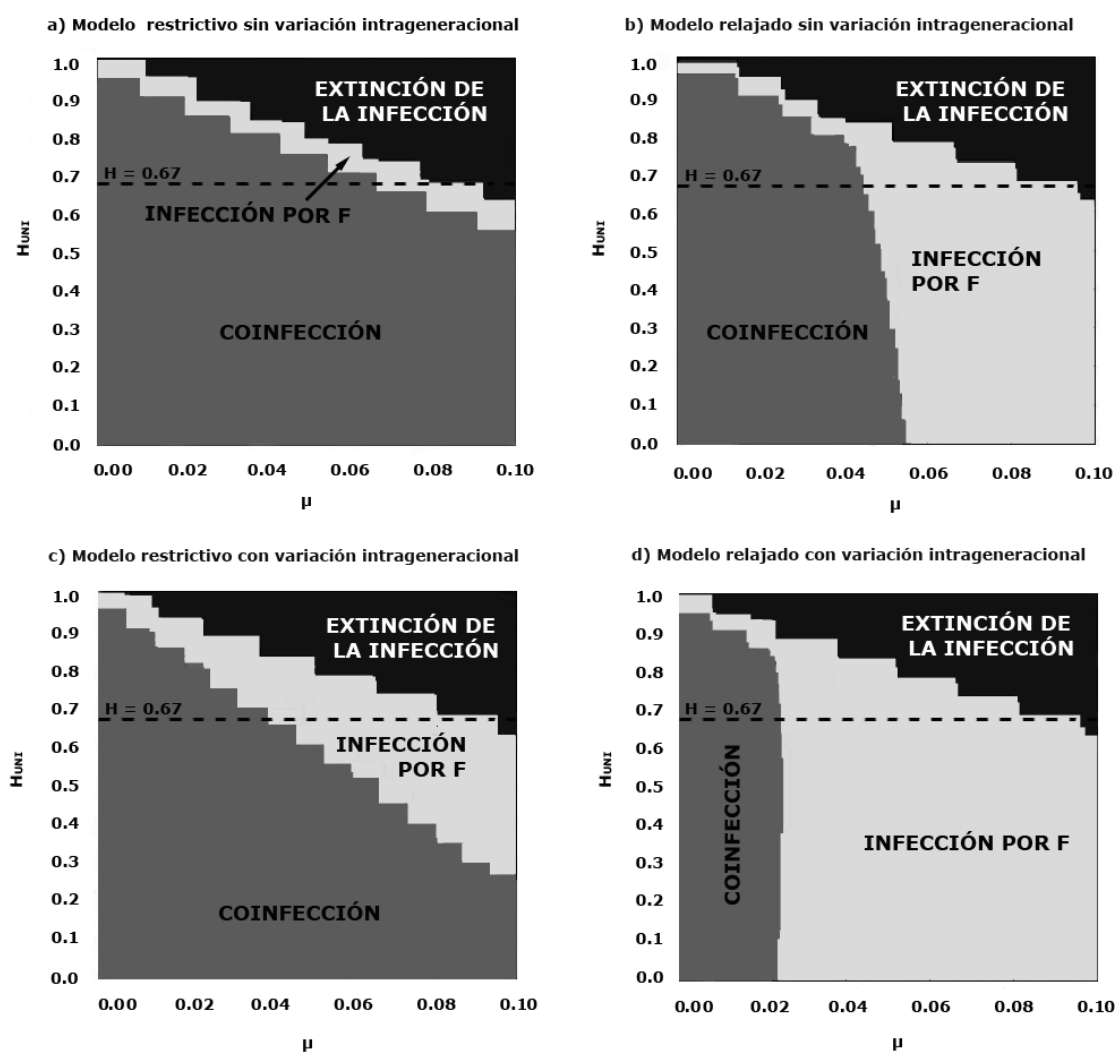


Fig. 33: Evolución de las frecuencias de infección considerando (o no) fluctuaciones intrageneracionales a partir de las frecuencias iniciales detectadas en la población de Cpe de Navafría (Sistema Central). Las simulaciones basadas en los modelos restrictivo y relajado sin considerar estas fluctuaciones se han resumido en la figura 33a y 33c, indicándose la prevalencia de la infección en el equilibrio (tras 4.000 generaciones). Las figuras 33b y 33d consideran las variaciones intra-generacionales detectadas experimentalmente. El área gris representa el predominio de la coinfección. El color gris claro significa la prevalencia de la infección por el supergrupo F y el área negra, la pérdida de la infección. Nótese que  $H=0$  implica incompatibilidad total, y  $\mu=0$ , significa una transmisión perfecta.

### *Modelo restrictivo con variación intrageneracional.*

Las simulaciones realizadas siguiendo este modelo muestran que la disminución de las frecuencias de infección a lo largo del verano dificulta la expansión de la coinfección. A su vez, se observa que este factor favorece bajo determinadas condiciones la infección mayoritaria por la cepa F. Bajo este modelo, es posible alcanzar un equilibrio en el que la infección mayoritaria sea por la cepa F, en un rango mayor de los parámetros transmisión e incompatibilidad citoplasmática, comparándose con el modelo restrictivo, que no incorpora la disminución de la coinfección a lo largo del verano.

Este rango de parámetros, incluye el valor  $H_{UNI}=0,67$ , estima experimental del nivel de incompatibilidad citoplasmática unidireccional provocada por *Wolbachia* en este ortóptero (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010). Si consideramos este valor, la infección mayoritaria por la cepa F podría mantenerse con un valor de  $\mu$  entre 0,04 y 0,095.

### *Modelo relajado, con variación intrageneracional.*

Las simulaciones llevadas a cabo bajo este modelo, predicen un incremento notable en el rango de valores para  $H$  y  $\mu$  que permiten el mantenimiento de la cepa F, a partir de las frecuencias iniciales de la población de Cpe de Navafría. Observamos que el mantenimiento de la coinfección se restringiría a condiciones con altísimas tasas de transmisión ( $\mu < 0,025$ ). Por el contrario, la infección por la cepa F es estable bajo un amplio rango de condiciones, incluyendo tasas altas de transmisión. A su vez, cabe destacar que la disminución de las tasas de coinfección en los machos permite alcanzar un equilibrio estable con una cepa F prevalente, incluso en condiciones donde la coinfección era el equilibrio sugerido por el resto de modelos.

La idoneidad de los distintos modelos testados será evaluada en función de su aproximación a la realidad en el apartado “Variación intra-generacional de la infección por *Wolbachia*”, pág. 237.

## **28 FILOGENIA Y FILOGEOGRAFÍA DE WOLBACHIA.**

### **28.1 Variabilidad de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*.**

Con el fin de analizar la variabilidad de la infección por este género bacteriano en la especie *Chorthippus parallelus* e inferir las posibles incompatibilidades entre cruzamientos como consecuencia de dicha variabilidad, se analizó la diversidad existente entre las cepas mediante el



análisis de varios marcadores (el gen *16S rRNA*, los 5 *loci* del MLST, y el gen *wsp*), así como su distribución geográfica.

## 28.2 Inferencia filogenética del gen *16S rRNA*.

El análisis filogenético de las variantes para el gen *16S rRNA* de *Wolbachia* infectando *C. parallelus*, confirman la pertenencia de las cepas bacterianas detectadas en individuos de esta especie a dos de los 8 supergrupos descritos para ella.

Se han obtenido secuencias idénticas a la perteneciente al supergrupo B recogida en *genbank* como *FJ438533* (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010), en distintos individuos de poblaciones dentro y fuera de la zona híbrida. Por otro lado, se han caracterizado secuencias idénticas a las *FJ438535*, *FJ438536*, *FJ438537* y *FJ438538*, obtenidas a su vez anteriormente en distintas poblaciones de esta especie, y que pertenecen al supergrupo F de este género bacteriano (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010).

Las secuencias se caracterizan por 52 posiciones variables en un total de 1305 pb secuenciadas, que nos permiten agruparlas en dos conjuntos: el primero de ellos, en el que se incluyen las secuencias *FJ438533* y *FJ438534*, con únicamente 2 posiciones variables; el segundo incluye las secuencias *FJ438535*, *FJ438536*, *FJ438537* y *FJ438538* con 13 posiciones variables. Existió más del 99% de homología entre las secuencias del mismo grupo, mientras que la similitud no superó el 97% entre ambos grupos de datos.

Se realizó un análisis de saturación mediante el test de Xia (Xia, 2001; Xia *et al.*, 2003), implementado en el software *DAMBE* (Xia, 2001; Xia & Z., 2001). No se observó saturación ( $p\text{-valor} \approx 0,000$ ) (Fig. 34) en las secuencias, por lo que se consideraron adecuadas para su utilización en estudios filogenéticos.

En comparación con la filogenia previamente descrita por Zabal-Aguirre *et al.* (2010), se estimaron las relaciones filogenéticas de dichas secuencias empleando ML e IB, considerando el gen *16S rRNA* de la bacteria *Rickettsia*, como grupo externo (ver Fig. 35). El modelo de sustitución nucleotídica fue obtenido mediante el software *jModeltest* (Posada, 2008). El modelo más adecuado, siguiendo el criterio AIC, para las secuencias empleadas en la inferencia fue el HKY+I+G. El valor obtenido para  $G=0,3810$  se estimó suficientemente bajo para evitar una nueva corrección del set de secuencias, por eliminación de las posiciones con mayores tasas de evolución nucleotídica.

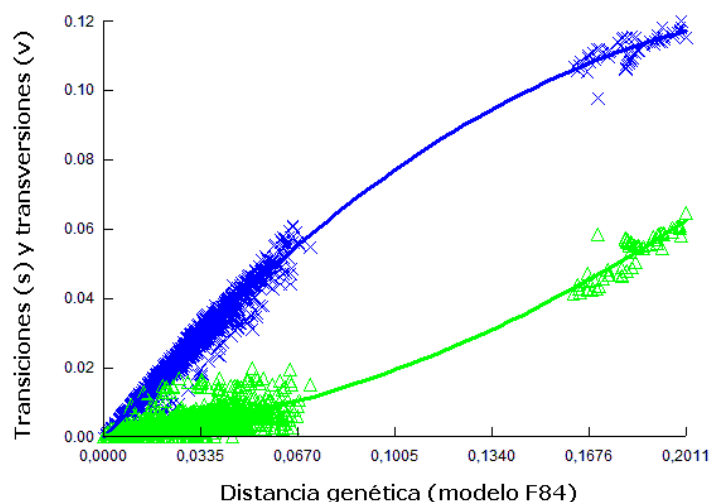


Fig. 34: Gráfico de transversiones/transiciones frente a distancia genética obtenido mediante el software *DAMBE*. Este gráfico nos permitiría visualizar el fenómeno de saturación en el caso de que las transversiones (verde) superaran a las transiciones (azul), a partir de una determinada distancia genética. En este caso concreto, la gráfica de transiciones/transversiones confirma la ausencia de saturación y por tanto, su idoneidad para análisis filogenéticos. El test de Xia *et al.* (2003) respalda dicha representación gráfica en todos los casos. Para la estima de la distancia genética, se utilizó el modelo *Felsenstein* (F84), que asume tasas diferentes para las transversiones y frecuencias nucleotídicas diferentes (Nei & Kumar, 2000).

En el caso del árbol obtenido mediante ML, se utilizó el modelo *GTR+I+G*, único implementado en el software *RaxML versión 7.0.4* (Stamatakis, 2006b).

Ambas topologías, obtenidas mediante ML o IB, incluyeron secuencias descritas para el supergrupo B y F respectivamente. Los valores de *Bootstrap* y probabilidad posterior se muestran en los nodos para dichos supergrupos en ambos árboles. Las topologías obtenidas fueron equivalentes y consistentes con estudios previos (Lo *et al.*, 2007).

Para evitar el efecto en la topología de “atracción de ramas largas” se descartó del análisis la secuencia para el gen *16S rRNA* de la cepa de *Wolbachia* que infecta a la especie *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). Aparentemente, la tasa de sustitución nucleotídica en esta cepa, descrita en la bibliografía como perteneciente al supergrupo F (Baldo *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2006), está incrementada respecto al resto de las analizadas. . Al contar con pocas secuencias para este supergrupo bacteriano, prescindir de esta cepa supone un conflicto. Finalmente, se decidió suprimir esta secuencia, dada la existencia de otras disponibles, como aquellas caracterizadas en las cepas que infectan a *Odontotermes* spp. (*Termitidae*) y que no provocaban este efecto en las topologías de los árboles al no estar incrementadas sus tasas de sustitución.

### 28.3 Análisis de las cepas de *Wolbachia* en *C. parallelus* mediante MLST.

127 individuos de *C. parallelus*, cuya infección había sido previamente caracterizada en función del gen *16S rRNA*, fueron analizados según el MLST de esta bacteria (Baldo *et al.*, 2006b). En total 110 individuos pudieron ser caracterizados al completo. En el resto de los casos, alguno de los genes no se pudo amplificar y/o secuenciar.

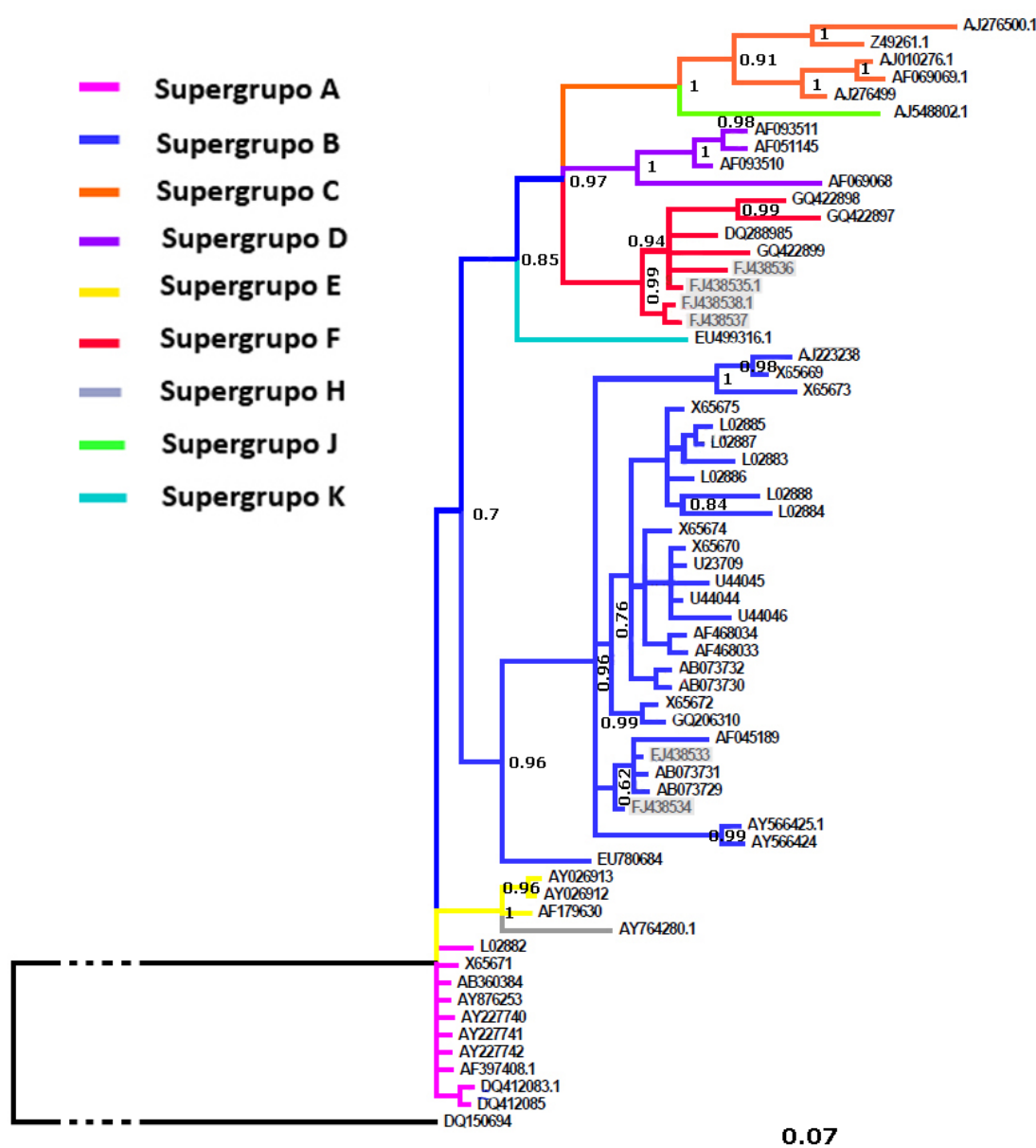


Fig. 35: Árbol filogenético enraizado reconstruido mediante inferencia bayesiana del gen *16S rRNA* de *Wolbachia*. Se utilizó la secuencia de *Rickettsia* sp. (DQ150694) como grupo externo. La línea discontinua indica el acortamiento de la raíz para facilitar la visualización del árbol. En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores. Las secuencias correspondientes a las cepas detectadas en *C. parallelus* aparecen sombreadas en gris.

### 28.3.1 Caracterización y clasificación de las cepas detectadas de *Wolbachia* empleando el MLST. Diversidad genética de los distintos *loci* analizados.

Con el fin de corroborar la idoneidad de los *loci* analizados para su inclusión en un sistema MLST (Maiden *et al.*, 1998; Baldo *et al.*, 2006), se realizó un análisis comparativo de la divergencia genética de los *loci* mediante el software *DnaSP* (Librado & Rozas, 2009). Los detalles de cada uno de los parámetros utilizados pueden consultarse en la Tabla B2 del anexo B. La amplificación y posterior secuenciación mediante los cebadores específicos descritos en el MLST (ver material y métodos, pág. 66), permitió la detección de una gran variabilidad de alelos para cada uno de los genes seleccionados. Este análisis, que corrobora los parámetros descritos por Baldo *et al.* (2006b) muestra, entre otros resultados (ver Tabla B5 del anexo B):

- (i) El *locus* menos variable en las cepas que infectan *C. parallelus* es el gen *gatB*, con 39 posiciones polimórficas (S). Este dato concuerda con las estimas de Theta (por sitio) o estimador del polimorfismo de acuerdo al neutralismo según Nei (1987), y Theta (por sitio) o estimador del polimorfismo de acuerdo al neutralismo según Watterson (1975). En ambas estimas, el gen *gatB* presentó valores más bajos que el resto de *loci* analizados.
- (ii) El *locus* más variable es *fbpA* con 61 posiciones variables (S) y una mayor diversidad nucleotídica por sitio (Pi). Al igual que en el caso anterior, las estimas de polimorfismo descritas por Watterson (1975) y Nei (1987) bajo la hipótesis de neutralismo, apoyan que este gen es el más polimórfico de los analizados.
- (iii) El *locus* con menor nivel de diversidad nucleotídica por sitio (Pi) es el gen *coxA*, muy próximo a los valores de *gatB*.
- (iv) Se detectaron 6 alelos para el gen *coxA*, 5 alelos para los genes *ftsZ* y *fbpA*, 5 alelos para *gatB* y 10 alelos en el caso del gen *hcpA*.
- (v) En relación a diversidad haplotípica, fueron los genes *gatB* y *ftsZ* los que presentaron valores más bajos, frente al gen *HcpA* con una mayor diversidad haplotípica.
- (vi) Fue el gen *ftsZ* es el que presentó un mayor número de posiciones variables media entre alelos, 17,29, frente al valor de 28,57 que fue estimado en el caso del gen *fbpA*.
- (vii) En cuanto a los test de neutralismo, tanto el test de Tajima, como los genes de FuliD, FuliF y FuFs apoyan que dichas secuencias no hayan evolucionado de forma neutra, como es de esperar en secuencias codificantes.



- (viii) El cálculo de Ka/Ks respalda la selección purificadora en los 5 *loci*, ( $ka/ks \ll 1$ ), una de las condiciones para que estos *loci* se incluyan dentro del sistema multilocus de esta bacteria. La inclusión de un mayor número de secuencias ha supuesto una ligera reducción de los valores para este estimador, respecto a los calculados por (Baldo *et al.*, 2006b) en la descripción de esta metodología de clasificación multilocus.
- (ix) Se ha detectado recombinación intragénica en los *loci ftsZ* y *fbpA*. Para su identificación se ha utilizado el software *RDP4* (Martin *et al.*, 2010a), considerando que las secuencias son lineales (en el caso de *loci* independientes, no concatenados), aplicando la corrección de Bonferroni y considerando como eventos posibles aquellos con p-valor  $< 0,01$  (Maynard Smith, 1992; Martin *et al.*, 2010a). En el caso del gen *ftsZ*, se ha detectado un posible evento de recombinación en el alelo 16 (descrito en *Gryllus firmus*). En el caso de *fbpA*, se han detectado posibles procesos de recombinación afectando a los alelos *fbpA*-7 (descrito en *Tribolium confusum*), *fbpA*-90 y *fbpA*-132. De estos dos últimos no existe hospedador identificado en las bases de datos.

### 28.3.2 Análisis filogenético de los distintos *loci* implementados en el MLST:

En todos los casos, los distintos alelos caracterizados en cepas que infectan a *C. parallelus*, fueron alineados con aquellos descritos en la base de datos MLST para el género *Wolbachia* (<http://www.mlst.org/wolbachia>). En los árboles mostrados los alelos aparecerán conforme a la designación oficial del MLST. El muestreo genético realizado puede consultarse en el anexo E.

Los alineamientos fueron corregidos mediante el software *Gblocks* (Castresana, 2000). En ningún caso se produjo una reducción drástica del número de pares de bases de los alineamientos. Como consecuencia del alto grado de conservación de las secuencias propuestas para caracterizar los alelos (Baldo *et al.*, 2006b), se mantuvieron de media el 97% de las posiciones.

A continuación se realizó un análisis de saturación en las posiciones 1 y 2, así como de la posición 3 de los alineamientos, utilizando para ello el software *DAMBE* (Xia, 2001; Xia & Z., 2001), y el test de saturación de Xia (Xia *et al.*, 2003; Xia & Lemey *et al.*, 2009).

En todos los casos se observó que no existía saturación en ninguna de las posiciones: el parámetro “Iss” o índice de saturación, era significativamente menor que el parámetro “Iss.c” o índice de saturación crítico, asumiendo tanto tipologías simétricas como asimétricas (para una explicación detallada de estos parámetros y su estima consultar Xia *et al.*, 2003; Xia & Lemey *et al.*, 2009). Este valor implica una baja saturación en la secuencia, lo que la hace adecuada para

su utilización en estudios filogenéticos. Se realizaron los gráficos correspondientes de transversiones y transiciones respecto a la distancia genética corregida (a modo de ejemplo, se muestra la Fig. 36). Sólo en el caso de las posiciones 1 y 2 del gen *fbpA*, se observó un posible efecto de saturación, que fue descartado a través del test de Xia. El motivo de este artefacto en el gráfico fue el escaso número de posiciones variables en las posiciones 1 y 2 en este gen, lo que hizo que la curva ajustada a los puntos correspondientes se desfigurara. Las diferencias observadas no son significativas.

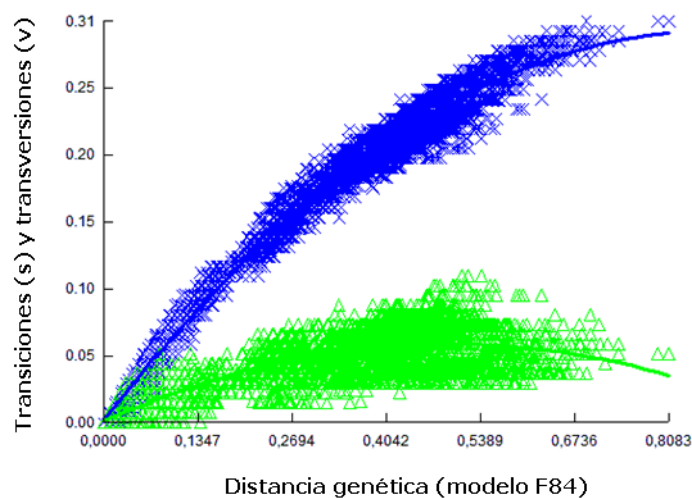


Fig. 36: Relación existente entre las distancias genéticas intraespecíficas (distancia F84) y los eventos mutacionales de transversión y transición. Este gráfico nos permitiría visualizar el fenómeno de saturación en el caso de que las transversiones (verde), superaran a las transiciones (azul) a partir de una determinada distancia genética. En este caso concreto, gráfica de transiciones/transversiones de la posición +3 del gen *coxA*, se observa la ausencia de saturación y por tanto, su idoneidad para análisis filogenéticos. Para la estima de la distancia genética, se utilizó el modelo *Felsenstein* (F84), que asume tasas diferentes para las transversiones y frecuencias nucleotídicas diferentes (Nei & Kumar, 2000).

La selección del modelo evolutivo para cada gen se estimó mediante el software *jModeltest* (Posada, 2008). Los modelos seleccionados fueron *GTR+G+I* en el gen *ftsZ*, y *GTR+G* para los genes *coxA*, *gatB*, *fbpA* y *hcpA*. En el caso de los genes concatenados, se asignaron los modelos evolutivos descritos para cada gen a cada una de las particiones. En el de los árboles construidos mediante ML, se empleó el modelo *GTR+I+G*, dado que incorpora el software *RaxML* versión 7.0.4 (Stamatakis, 2006; Stamatakis *et al.*, 2007).

Cabe destacar la similitud de algunos de los alelos adscritos al supergrupo B detectados en *C. parallelus* con secuencias detectadas en otro acrídido, *Podisma pedestris* (resultados no

mostrados en este trabajo), y que han sido descritos recientemente fruto de la colaboración con el laboratorio del Prof. Richard Nichols (QMWC, University of London).

#### *Clasificación filogenética de alelos no clasificados previamente en la bibliografía.*

Aunque no es un objetivo concreto de esta tesis, se ha analizado la posición filogenética de varios alelos, aun no adscritos a ningún supergrupo en la bibliografía, pero que están disponibles en las bases de datos. Concretamente, se han analizado las cepas detectadas en *Cordylochemes scorpioides* (Pseudoescorpiones) (STs 168 y 169), así como las caracterizadas en *Hylyphantes graminicola* (Aranaeae) (STs 173 al 186). La elección de estas cepas se debe a que pese a que el hospedador ha sido descrito y publicado, no se ha determinado el supergrupo/supergrupos que infectan a estas especies. En este último caso (*Hylyphantes graminicola*), sólo se había realizado un estudio filogenético de los genes concatenados, si bien, no se habían analizado los genes de forma individual (Yun *et al.*, 2011).

En la base de datos del sistema MLST existe otra serie de cepas, en las que ni el supergrupo, ni el hospedador se han hecho público. En este caso, al no poder relacionar cepas y hospedadores, no se ha procedido a su comparación con aquellas detectadas en *C. parallelus*. De todas maneras, dado que están incluidas en los análisis filogenéticos, su adscripción a los distintos supergrupos puede ser consultada en función del código de colores de cada uno de los árboles filogenéticos construidos para los distintos genes.

Todos los árboles filogenéticos están disponibles en formato electrónico (DVD anexo) para facilitar su visualización detallada. En este texto sólo se muestra una versión simplificada de los mismos.

#### *Gen coxA.*

La reconstrucción filogenética a partir de los alelos descritos en la base de datos del MLST (<http://pubmlst.org/Wolbachia>), permitió la adscripción de los distintos alelos del gen *coxA* detectados en individuos de *C. parallelus* a los supergrupos F y B de esta bacteria (Fig. 37). En función de ello, podemos deducir que los alelos H2, H3, H5 y H6 de este gen pertenecen al supergrupo B, mientras que los alelos H1 y H4 pertenecen al supergrupo F de *Wolbachia* (ver Fig. 38 y Fig. 39)

Tras adscribir los distintos alelos a los supergrupos F y B, procedimos a calcular de nuevo las estimas de diversidad (Tabla B6 del anexo B) para los dos grupos, mediante el software *DnaSP* (Librado & Rozas, 2009).

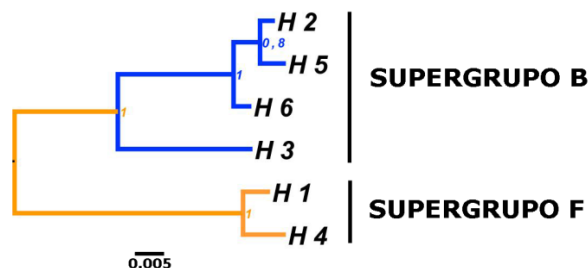


Fig. 37: Esquema mostrando la asignación de los distintos alelos descritos a los supergrupos F y B de *Wolbachia*, de acuerdo con la Fig. 38 y Fig. 39.

#### *Inferencia filogenética bayesiana.*

El estudio filogenético de las secuencias obtenidas en este estudio, junto con el de aquellas disponibles en las bases de datos, nos permite clasificar los alelos descritos, y a su vez caracterizar los alelos más próximos a los detectados, así como identificar a sus hospedadores. De este modo, podemos deducir que los alelos H2 y H6 están relacionados con el alelo 36 de este gen de *Wolbachia*, que ha sido caracterizado en *Lycaeides idas* (Lepidoptera) así como en el hospedador cuyo código en la base de datos es B\_M14my1, infectado por el ST-84 (en terminología MLST) de *Wolbachia*. Por otro lado, el alelo H3, está relacionado con el alelo 64, detectado en individuos de *Thersamonia thersamon* (Lepidoptera). Finalmente, el alelo H5, se asemeja al alelo 16, detectado en *Gryllus firmus* (Orthoptera).

#### *Inferencia filogenética por máxima verosimilitud.*

La topología inferida mediante esta metodología fue muy similar a la obtenida mediante inferencia bayesiana, salvo algunos casos concretos que serán analizados a continuación.

#### *Comparación de topologías.*

Entre ambas topologías existieron discrepancias acerca de la posición de algunos alelos, si bien en el caso de los alelos detectados en *C. parallelus* mantienen su adscripción al supergrupo F o B independientemente de la metodología (Fig. 40). Existieron diferencias relevantes en la estimación de la longitud de las ramas. Por su parte el árbol obtenido por IB estimó ramas mucho más largas que en el caso del árbol obtenido mediante ML. Además, el árbol obtenido por IB no permitió resolver algunos clados correctamente, debido a la similitud entre las secuencias, que en ocasiones sólo difieren en un nucleótido. La resolución de estos clados propuesta tanto por IB, como por ML debe ser considerada con precaución, debido a la

baja probabilidad posterior, o los bajos valores de *bootstrap* obtenidos respectivamente en las ramas exteriores del árbol.

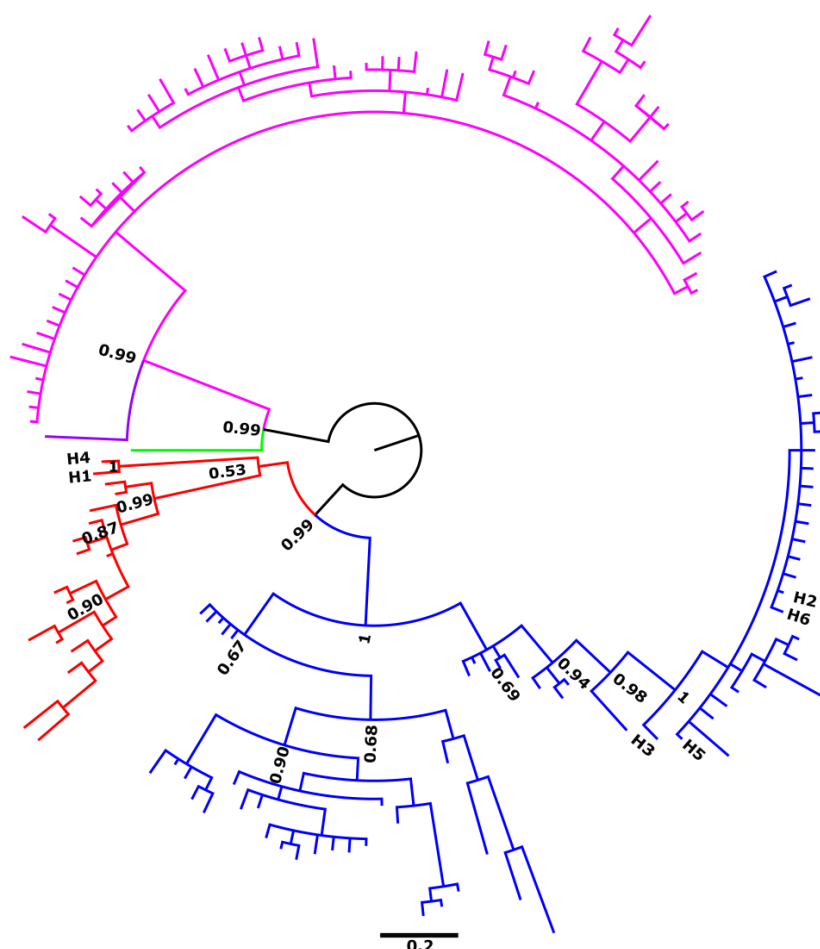


Fig. 38: Árbol filogenético no enraizado del gen *coxA* de *Wolbachia*, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H6. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores.

Pese a estas discrepancias, los distintos supergrupos de *Wolbachia* fueron resueltos correctamente mediante ambas metodologías, y los alelos del gen *coxA* amplificados en cepas de *Wolbachia* que infectaban a *C. parallelus*, fueron claramente adscritos a cada uno de estos supergrupos.

Sin embargo existen ciertas discrepancias en el caso del supergrupo F. El árbol obtenido mediante IB propone que los alelos 89 y 90 para este gen se adscribiesen al supergrupo F, aunque el árbol elaborado mediante ML plantea que estos alelos constituyan un clado diferente, aislado del supergrupo F. En ambos análisis, el soporte estadístico expresado como probabilidad

posterior o *bootstrap* respectivamente, tanto para la inclusión en este clado como para su exclusión, fue bajo, por lo que hay que interpretar estos datos con extrema precaución.

Debido al interés particular que suscitaba la posición de los alelos 89 y 90 (pertenecientes al supergrupo F en el caso del árbol inferido mediante IB, pero que se situaban fuera de este clado en el árbol construido por ML), se realizó un análisis de topologías utilizando el test AU (*"Aproximately Unbiased"*) (Shimodaira, 2002), el de Kishino-Hasegawa (KH) (Kishino & Hasegawa, 1989) y el test de Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira & Hasegawa, 1999) implementados en el software *CONSEL* (Shimodaira & Hasegawa, 2001), así como el software *TREE-PUZZLE* (Schmidt *et al.*, 2002).

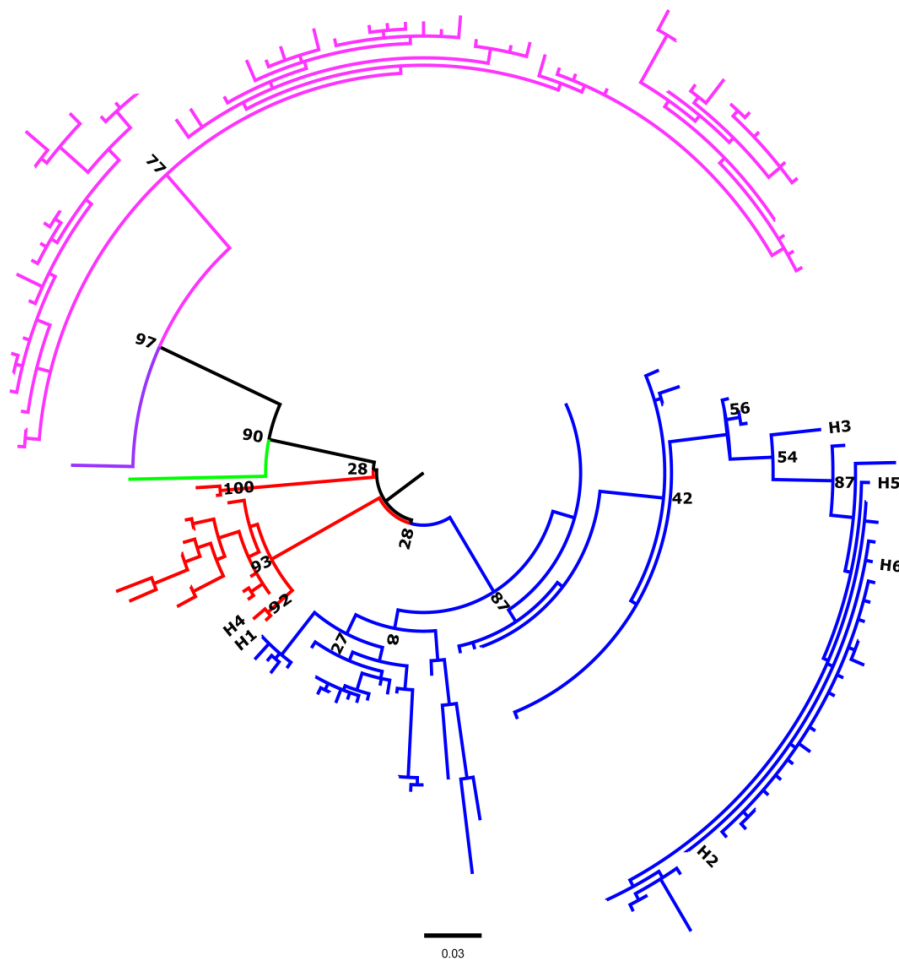


Fig. 39: Árbol filogenético no enraizado del gen *coxA* de *Wolbachia*, obtenido mediante máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H6. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos.

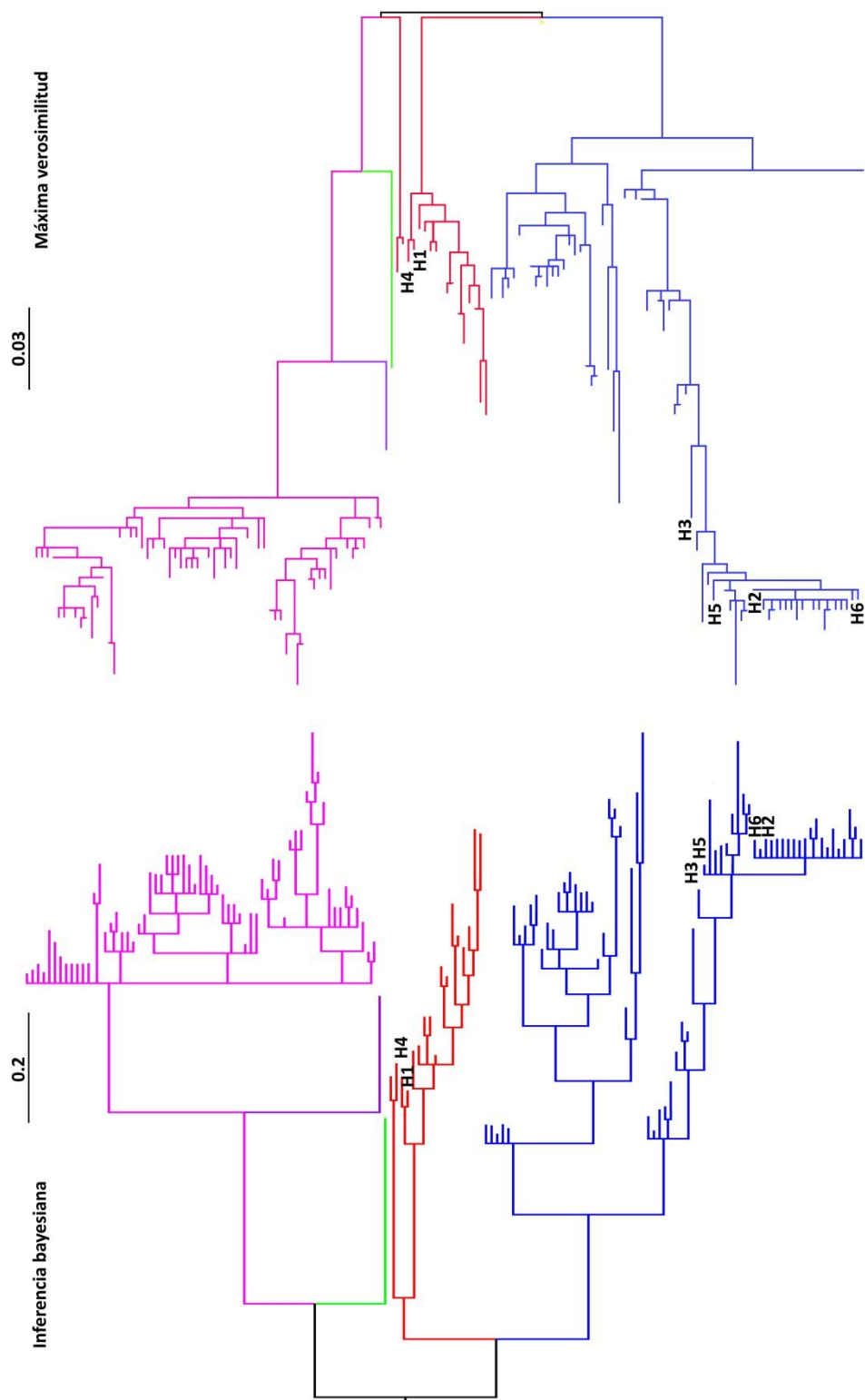


Fig. 40: Comparación de topologías entre el árbol filogenético reconstruido mediante inferencia bayesiana, y aquel reconstruido empleando máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H6. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado).

En primer lugar consideramos como el “mejor árbol” a la topología obtenida mediante IB (en la que ambos alelos se adscriben al supergrupo F), y lo comparamos con la topología alternativa (en la que ambos alelos quedan excluidos del supergrupo F). Los distintos test apoyan ( $\alpha=0,05$ ) que el árbol que incluye ambos alelos en el supergrupo F es más probable que su árbol alternativo (AU: 0,021, KH:  $p=0,047$ , SK:  $P=0,047$ ).

Cuando comparamos el árbol obtenido mediante ML (que excluía los alelos 89 y 90 del supergrupo F) con el árbol alternativo en el que se han incluido manualmente los alelos 89 y 90 en el clado F, el test apunta ( $\alpha=0,05$ ) a que ambos árboles son igual de probables (AU:  $p=0,467$  KH:  $p=0,463$ , SK:  $P=0,467$ ).

Por tanto consideramos que nuestros datos apoyan la pertenencia de estos alelos, también detectados en pseudoscorpiones (*Cordylochernes scorpoides*), al supergrupo F de *Wolbachia*, como sugerían Zeh *et al.* (2005) basándose en la filogenia construida a partir de las secuencias del gen *wsp*. Pese a ello, estos resultados deben considerarse con precaución. La inclusión en el futuro de un mayor número de secuencias pertenecientes a los supergrupos D, E y F, facilitará la correcta clasificación de estos alelos.

Por otro lado, se caracterizaron los alelos detectados en las cepas que infectan a *Aranaeae* (STs 173 al 186), debido a que estos alelos, como comentamos previamente, no habían sido clasificados en la bibliografía. Los alelos 14, 86, 91, 98, 99, 100, 101 y 102 se adscriben al supergrupo B, mientras que los alelos 103 y 104 se adscriben al supergrupo A de esta bacteria. Estos datos apoyan la filogenia parcial realizada por Yun *et al.* (2011).

### *Divergencia entre los alelos.*

La estimación de los tiempos de divergencia entre los alelos descritos en cada uno de los *loci* puede ser problemática debido a la ausencia de datos paleontológicos o geológicos que nos permitan datar nuestros árboles filogenéticos. Los datos detallados se muestran en la Tabla B7, del anexo B.

Sin embargo, en otras ocasiones se han empleado relojes moleculares bacterianos como una aproximación a estas tasas de divergencia (Raychoudhury *et al.*, 2009). Dichos estudios calculan una tasa de divergencia sinónima en torno a 0,90% por millón de años en bacterias, si bien estas estimas pueden variar en los distintos linajes bacterianos, por lo que deben emplearse con mucha precaución. En el caso del gen *coxA*, los dos alelos adscritos al supergrupo F, divergieron con una tasa de  $Ks-JC=0,037$ . Esta estima supone la divergencia en hace aproximadamente 41.000 años. En el caso de los alelos adscritos al supergrupo B, se observa que las tasas de divergencia entre las cepas detectadas en poblaciones tan distantes



como Navafría, en el Sistema Central ibérico (H2) e Inglaterra (H5), implica que ambas cepas pudieron divergir hace aproximadamente 13.000 años. Estas estimas, considerando su rango de error, son congruentes en los distintos genes, y pueden coincidir con la historia filogeográfica del hospedador. Este hecho será discutido posteriormente.

Cabe destacar que se observa una mayor divergencia entre aquellos alelos detectados en la zona híbrida, respecto a alelos detectados en la Península Ibérica o en el resto de Europa. Debemos tener en cuenta que la estima de divergencia realizada, asume la existencia de un reloj molecular uniforme en todas las ramas. Sin embargo, si existiese una mayor tasa de cambio en determinadas cepas que en otras, por ejemplo en aquellas presentes en poblaciones híbridas, esto supondría sobrestimas del tiempo de divergencia de estas cepas respecto al resto.

### *Gen fbpA.*

La reconstrucción filogenética a partir de los alelos descritos para el gen *fbpA* permitió la adscripción de los distintos alelos del gen *fbpA* detectados en individuos de *C. parallelus* a los supergrupos F y B de esta bacteria. Como resultado, podemos adscribir los alelos H1, H4 y H5 al supergrupo F de *Wolbachia*, mientras que los alelos H2 y H3 se asignan al supergrupo B. Como hicimos anteriormente, las estimaciones de diversidad pueden consultarse en la Tabla B6 del anexo B.

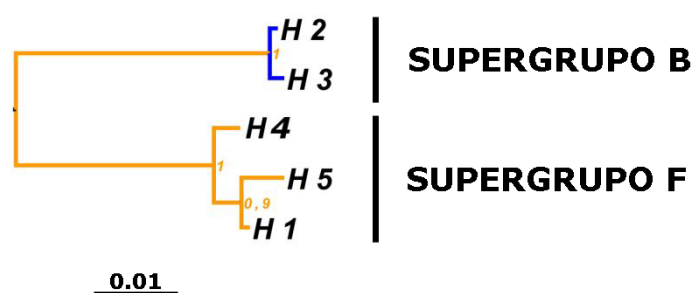


Fig. 41: Esquema mostrando la asignación de los distintos alelos descritos a los supergrupos F y B de *Wolbachia*, de acuerdo con las Fig. A3 y A4 del anexo A.

### *Inferencia filogenética bayesiana y por máxima verosimilitud.*

La inferencia bayesiana muestra que los alelos con mayor similitud respecto a H1 y H5 son los alelos 145 y 169, cuyos hospedadores no han sido descritos en las bases de datos (Fig. A3 y A4 del anexo A). Los alelos correctamente descritos más cercanos son aquellos caracterizados en *Ocymyrmex picardi* (Hymenoptera), u *Opisthophthalmus chapera* (Scorpiones). Por otro lado, los alelos pertenecientes al supergrupo B, H2, y H3, son próximos a alelos

caracterizados en hospedadores diversos, tales como *Macrosteles fascifrons* (Hemiptera) en el caso del alelo 197, *Laodelphax striatellus* hemíptero también cuyo hábitat incluye Europa y Asia (Wilson & Claridge, 1991), *Sogatella furcifera* (Hemiptera) en el caso del alelo 162, y *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera) en el del alelo 132 (ver figuras A3 y A4, del anexo A). La fig. A4 (anexos) muestra la topología obtenida por ML, siendo ésta similar a la descrita.

### *Comparación de topologías.*

Ambas topologías permiten caracterizar correctamente los distintos alelos detectados en *C. parallelus* (ver figura A5 del anexo A). Respecto a otras ambigüedades descritas en la bibliografía, la comparación de topologías permite observar que en ambos casos, los alelos 166 y 167 del gen *fbpA* detectados en pseudoscorpiones (*Cordylochernes scorpioides*) se adscriben al supergrupo F de *Wolbachia*, como sugerían Zeh *et al.* (2005) basándose en la filogenia construida a partir de las secuencias del gen *wsp*, y como aparentemente sugería el análisis filogenético del gen *coxA*. Por otro lado, se caracterizaron los alelos 9, 27, 175, 176, 178 y 179 detectados en las cepas que infectan a *Hylyphantes graminicola* (Aranaeae) (STs 173 al186). Los alelos 9, 27, 175 y 176 se adscriben al supergrupo B, mientras que los alelos 178 y 179 están relacionados con el supergrupo A de esta bacteria. Estos datos apoyan la filogenia parcial realizada por Yun *et al.* (2011).

### *Divergencia.*

En el caso del gen *fbpA*, los alelos H1 y H5 adscritos al supergrupo F, detectados en poblaciones tan distantes como la de Eslovenia y localizaciones ibéricas, incluidas aquellas situadas en el Sistema Central, divergieron en una tasa de  $Ks-JC=0,0298$ . Esta estima permite inferir que ambas cepas bacterianas divergieron hace aproximadamente 18.600 años. Estas estimas deben tomarse siempre con mucha precaución, debido a las limitaciones expuestas anteriormente.

En el caso de los alelos adscritos al supergrupo B de *Wolbachia* (alelos H2 y H3), se observa que las tasas de divergencia entre las cepas son menores: ambas cepas divergieron presuntamente hace aproximadamente 10.800 años. Los datos detallados pueden consultarse en la Tabla B8, del anexo B.

El análisis filogenético nos permite determinar los alelos más próximos a los detectados en *C. parallelus*, así como identificar a sus hospedadores. Los datos de los que disponemos nos permiten determinar que los alelos pertenecientes al supergrupo F, esto es, los alelos H1, H4 y

H5, se asemejan al alelo 31 de *Wolbachia* para el gen *fbpA*, caracterizado en el escorpión *Opisthophthalmus capensis* (Scorpiones)

Por otro lado, los alelos H2 y H3 están relacionado con los alelos 197, 244 o 185 de este gen, cuyos hospedadores no son públicos en la base de datos.

A través del test MaxChi, implementado en el software *RDP4* (Maynard Smith, 1992; Martin *et al.*, 2010a), se han detectado posibles eventos de recombinación en los alelos *fbpA*-7 (endosimbionte de *Tribolium confusum*) (Baldo *et al.*, 2006b), *fbpA* 90 (hospedador no identificado) y *fbpA*-132 (hospedador no identificado) ( $p < 0,01$  MaxChi test). Sin embargo, dado que estos sucesos de recombinación se habrían producido dentro del propio supergrupo B, no se han detectado alteraciones destacables en la topología del árbol.

### *Gen ftsZ.*

La reconstrucción filogenética del gen *ftsZ* a partir de los alelos descritos en la base de datos del MLST, permitió la clasificación de los alelos del gen *ftsZ* detectados en las cepas de *Wolbachia* que infectan a individuos de *C. parallelus* en los supergrupos F y B de esta bacteria (Fig. 42). De este modo, podemos adscribir los alelos H2 y H5 al supergrupo F de *Wolbachia*, mientras que los alelos H1, H3 y H4 lo hacen al supergrupo B. Las estimaciones de diversidad para este gen, agrupando a sus alelos en función del supergrupo al que han sido adscritos, pueden consultarse en la Tabla B6 del anexo B.

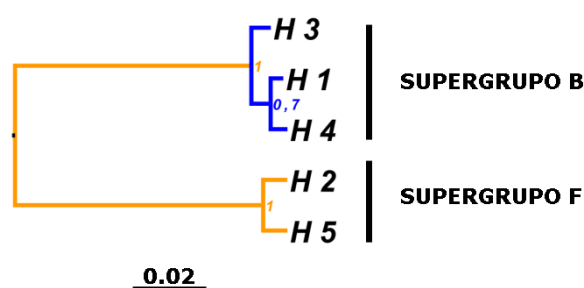


Fig. 42: Esquema mostrando la asignación de los distintos alelos descritos del gen *ftsZ* a los supergrupos F y B de *Wolbachia*, de acuerdo con la Fig. A6 y A7 del anexo A.

### *Inferencia filogenética bayesiana y por máxima verosimilitud.*

El análisis filogenético por inferencia bayesiana (Fig. A6 y A7 del anexo A) permite conocer cuáles son los alelos más próximos a los detectados en *C. parallelus*, e identificar a sus hospedadores. En este sentido, los alelos H1 y H4, se corresponden con el alelo 106, cuyo hospedador no ha sido identificado. El alelo H3, está relacionado con el alelo 7 de esta bacteria,

detectado en hospedadores no descritos: *B\_NY\_Chloro150737a*, *Chloro150737a*, *B\_M14My1*, así como en *Lycaedes idas* (Lepidoptera), y en *Nasonia vitripennis* (Himenoptera). Por otro lado, los alelos H2 y H5 equivalen al alelo 68, detectado en la avispa *Ocymyrmex picardi* (Himenoptera). La topología inferida por máxima verosimilitud está descrita en la Fig. A7 del anexo A.

A través del test *MaxChi*, implementado en el software *RDP4* (Maynard Smith, 1992; Martin *et al.*, 2010a), se han detectado posibles eventos de recombinación afectando al alelo *ftsZ*-16 (descrito en la cepa de *Wolbachia* que infecta a *Grillus firmus*) ( $p < 0,01$  MaxChi test). En el caso del alelo *ftsZ*-16, éste se sitúa en la filogenia entre los supergrupos A y B, lo que puede ser consecuencia de un suceso de recombinación entre supergrupos.

En el caso del gen *fbpA*, el alelo 83 detectado en pseudoscorpiones (*Cordylorchernes scorpoides*) se adscribe, como en el caso anterior, al supergrupo F de *Wolbachia*. Estos resultados apoyan las propuestas de Zeh *et al.* (2005) basándose en la filogenia construida a partir de las secuencias del gen *wsp*.

También se prestó especial atención a la caracterización de los alelos 9, 15, 81, 89, 90, 91, 92 y 93 detectados en las cepas que infectan a *Hylyphantes graminicola* (Araneae) (STs 173 al186). Los alelos 9, 15, 81, 89, 90 y 91 se adscriben al supergrupo B, mientras que los alelos 92 y 93 están relacionados con el supergrupo A de esta bacteria. Estos datos apoyan la filogenia parcial realizada por Yun *et al.* (2011). La comparación de topologías puede consultarse en la figura A8 de los anexos.

### *Divergencia entre alelos.*

Los alelos H2 y H5 del gen *ftsZ*, adscritos al supergrupo F, se detectaron en poblaciones eslovenas y del sistema central respectivamente, divergieron hace aproximadamente 33.500 años ( $Ks-JC=0,030$ ). De nuevo, las estimas de  $Ks$  entre aquellos alelos adscritos al supergrupo B (H2 y H4) fueron menores. En este caso, se estimó que ambos alelos divergieron hace 10.800 años. Los datos detallados pueden consultarse en la Tabla B9 del anexo B.

### *Gen hcpA.*

El análisis filogenético del gen *hcpA* permitió clasificar los alelos de este gen en los supergrupos F y B de esta bacteria. En la Fig. 43, se observa que los alelos H1, H3, H6, H8 y H9 se adscriben al supergrupo F de *Wolbachia*, mientras que los alelos H2, H4, H5, H7 y H10 se vinculan al supergrupo B. Las estimas, como en casos anteriores se realizaron mediante el software *DnaSP* (Librado & Rozas, 2009) y se muestran en la Tabla B6 del anexo B.

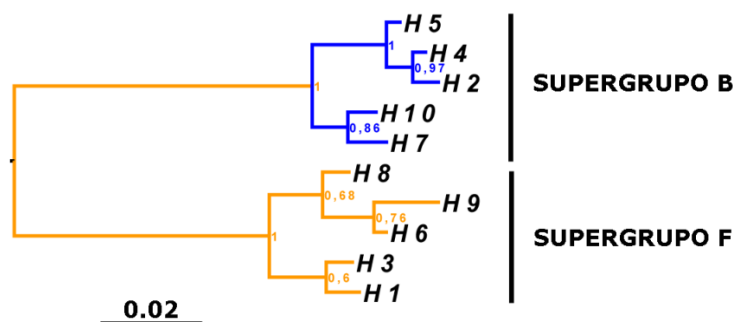


Fig. 43: Esquema mostrando la asignación de los distintos alelos descritos a los supergrupos F y B de *Wolbachia*, de acuerdo con la Fig. A9 y A10 del anexo A.

### *Inferencia filogenética bayesiana.*

Este análisis (Fig. A9 del anexo A) nos permite detectar los alelos más parecidos a aquellos que hemos detectado en *C. parallelus*, así como sus hospedadores. Como hemos mencionado, esto es importante a la hora de analizar el origen de la infección en este ortóptero (ver discusión). En el caso del gen *HcpA*, los alelos H1, H3, H6, H8 y H9, muy próximos entre sí, se asemejan a los alelos 35, 36, 77 o 72, cuyos hospedadores son *Opisthophthalmus latimanus* (Scorpiones), *Opisthophthalmus granifrons* (Scorpiones), *Opisthophthalmus chaperi* (Scorpiones), *Ocymymex picardi* (Himenoptera).

A su vez, los alelos H2, H4, y H5, adscritos al supergrupo B de esta bacteria, se asemejan a los alelos 6, 205 y 143 de este gen, detectados en *Tribolium confusum* (Coleoptera), *Polistes dominulus* (Himenoptera), *Tetrastichus coeruleus* (Himenoptera) o *Libythea myrrha* (Lepidoptera). Finalmente, los alelos H7 y H10, son similares a los alelos 142, 188 y 88, detectados en los hospedadores cuyo código es Dinn\_B, B\_SFCh1 y B\_SFCh2. No existen más datos publicados.

La Inferencia filogenética (Fig. A10 del anexo A) por máxima verosimilitud confirma la filogenia descrita previamente, con modificaciones puntuales que serán analizadas a continuación y que no afectan a la topología global del árbol.

### *Comparación de topologías.*

Ambas topologías son en gran parte congruentes, sin embargo existen algunas ambigüedades (Fig. A11 del anexo A). En el caso del gen *hcpA*, los alelos 107 y 108, detectados en pseudoscorpiones (*Cordylocheres scorioides*), se adscriben con escaso soporte al supergrupo B. Para comprobar si efectivamente dichos alelos están relacionados con este

supergrupo, o por el contrario de adscriben al supergrupo F como sugieren los resultados previos, se ha realizado un test de topologías comparando ambos árboles.

Este análisis compara la topología obtenida mediante ML, con un árbol alternativo, en el cual, los alelos 107 y 108, se sitúan en la base del clado correspondiente al supergrupo F, como sugieren estudios previos. Los distintos test apuntan ( $\alpha=0,05$ ) a que ambos árboles son igual de probables (AU:  $p=0,186$  KH:  $p=0,215$ , SK:  $P=0,215$ ), por lo que, en conjunto con los datos previos, apoyamos la hipótesis de que estas cepas pertenezcan al supergrupo F.

También se caracterizaron los alelos 29, 87, 119, 120, 121, 122 y 123 de este gen *hcpA*, detectados en cepas de *Wolbachia* que infectan a *Hylyphantes graminicola* (Aranaeae) (STs 173 al 186). En este caso, se observó que los alelos 29, 87, 119, 120, 121, 122 se adscriben al supergrupo B, mientras que el alelo 123 está asociado al supergrupo A. Hay que matizar que el alelo 120 fue detectado en cepas bacterianas que habían sido caracterizadas como pertenecientes al supergrupo A. Esto apoya la existencia de posibles eventos de recombinación entre los supergrupos A y B, detectados previamente por Yun *et al.* (2011).

#### *Divergencia entre alelos.*

En el caso del gen *hcpA*, los alelos H1 y H8 adscritos al supergrupo F y que se han detectado en las poblaciones de Eslovenia y Navafría, divergieron en una tasa de  $Ks-JC=0,0423$ . Esta estima supone una divergencia de hace aproximadamente 47.000 años. En el caso de los alelos adscritos al supergrupo B, H5 y H7, detectados en poblaciones híbridas y puras, ambas cepas pudieron divergir hace apenas aproximadamente 35.000 años. En el caso del supergrupo B, se han observado estimas superiores al resto de *loci* analizados. Este hecho coincide con su mayor diversidad, lo que puede suponer una sobrestima de los tiempos de divergencia. Recordemos que estas divergencias deben tomarse siempre con mucha precaución, debido a las limitaciones de la técnica, si bien son la única alternativa ante la imposibilidad de datar mediante fósiles o eventos geológicos. Los detalles pueden consultarse en la Tabla B10 del anexo B.

#### *Gen gatB.*

El análisis filogenético realizado a partir de los alelos del gen *gatB*, permitió asignar los alelos detectados en *C. parallelus* a los supergrupos F y B de esta bacteria. En este caso, los alelos H1, H3 y H5 se adscriben al supergrupo B de *Wolbachia*, mientras que los alelos H2 y H4 se atribuyen al supergrupo F (Fig. 44)

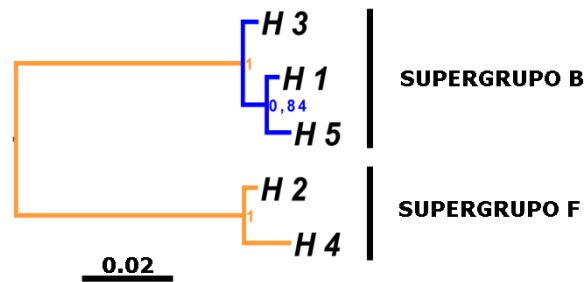


Fig. 44: Esquema mostrando la asignación de los distintos alelos del gen *gatB* descritos, a los supergrupos F y B de *Wolbachia*, de acuerdo con la Fig. A12 y A13 del anexo A.

A su vez, y tras clasificar los alelos descritos en función de que se puedan adscribir al supergrupo F o al supergrupo B, se ha procedido a analizar las estimas de diversidad considerando dicha clasificación. Los datos pueden consultarse en la Tabla B6 del anexo B. A continuación se realizó la reconstrucción filogenética de este gen, utilizándose tanto IB, como inferencia por ML. Ambas metodología ofrecieron topologías similares.

#### *Inferencia filogenética bayesiana y por máxima verosimilitud.*

Con este análisis (Fig. A12 del anexo A) pretendemos clasificar los alelos descritos en *C. parallelus* y a su vez, detectar aquellos más próximos filogenéticamente a los detectados en nuestro hospedador. Por otro lado, es de especial relevancia conocer en qué organismos han sido detectados, de cara a valorar el origen de la infección (ver el apartado de Discusión).

En el caso del gen *gatB*, los alelos H1 y H5 están relacionados con el alelo 9 de este gen, detectado en un amplio grupo de hospedadores pertenecientes a varios órdenes: *Tetrastichus coeruleus* (Himenoptera), *Hylyphantus graminicola* (Araneae), *Acraea eponina* (Lepidoptera), *Chelymorpha alternans* (Coleoptera), *Nasonia vitripennis* (Himenoptera), *Teleogryllus taiwanemma* (Orthoptera), *Lycaeides idas* (Lepidoptera), *Polistes dominulus* (Himenoptera), así como en los hospedadores B\_SFChI, B\_SFChI2, y B\_NY\_Chloro150737a.

A su vez, el alelo H4 detectado en *C. parallelus* se asemeja al alelo 73, caracterizado en el hospedador *Ocymyrmex picardi* (Himenoptera). Por último, el alelo H3 es similar al alelo 134, cuyo hospedador no ha sido descrito.

Como en los casos anteriores, se ha prestado atención a la posición filogenética de los alelos 110 y 111 detectados en pseudoscorpiones (*Cordylorchernes scorpoides*), que se adscriben claramente al supergrupo F, soportando los datos preliminares de (Zeh *et al.*, 2005). A su vez, en el caso de la infección que afecta a *Hylyphantus graminicola* (Araneae), los alelos detectados en 9, 39, 109, 119, 120, 121 y 122 pertenecerían al supergrupo B. Los alelos 123 y 124 se

adscribirían al supergrupo A. Los resultados fueron similares en caso del análisis mediante máxima verosimilitud, de tal modo que los distintos alelos fueron clasificados en el mismo supergrupo (Fig. A13 del anexo A) La comparación de las topologías puede consultarse en la Fig. A14 del anexo A.

#### *Divergencia entre alelos.*

En el caso del gen *gatB*, los alelos H2 y H4 clasificados dentro del supergrupo F y detectados en poblaciones distantes, incluyendo Eslovenia y Navafría (Sistema Central), divergieron en una tasa de  $Ks-JC=0,0259$ . Esta estima nos permite inferir que divergieron hace aproximadamente 19.900 años, y es menor en el caso de los alelos que han sido clasificados dentro del supergrupo B. Las tasas de divergencia entre H1 y H3, cepas detectadas en poblaciones híbridas y puras, implica que ambas cepas pudieron divergir hace aproximadamente 14.000 años. Hay que volver recordar que estas estimas deben tomarse siempre con mucha cautela, debido a las limitaciones de la metodología expuestas anteriormente. Los datos pueden consultarse en la Tabla B12 del anexo B.

### **28.3.3 Clasificación de las cepas detectadas infectando a *C. parallelus***

#### *Clasificación de las cepas: Análisis mediante START2.*

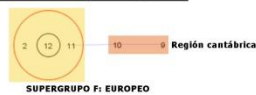
El software *START2* (Jolley *et al.*, 2001) ha sido especialmente diseñado para trabajar con archivos de cepas identificadas en función de los sistemas de clasificación multilocus. Permite clasificar a los distintos ST en “complejos ST” en función del número de *loci* que compartan, en nuestro caso, 3 *loci* de los 5 analizados.

En relación a los alelos que presenta cada uno de los individuos analizados, y siguiendo la convención del MLST, se pueden distinguir 33 ST diferentes (denominados como Cp\_ST(número)). Esto implica 33 combinaciones distintas de los diferentes alelos detectados para cada uno de los 5 *loci* analizados (Tabla 6).



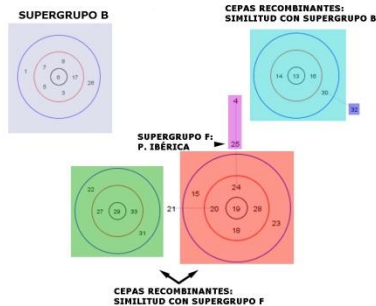
ST	Tipo	%	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	COMPLEJO ST
1	R	1,03	1	1	5	1	5	ST2
2	R	1,03	1	2	3	2	5	ST1
3	B	1,03	1	2	5	1	2	ST2
4	R	1,03	1	4	8	4	1	ST5
5	R	1,03	1	5	3	1	2	ST2
6	B	10,31	1	5	5	1	2	
7	B	1,03	1	5	5	1	3	
8	R	1,03	1	5	5	2	2	
9	R	1,03	2	1	1	1	2	ST1
10	F	2,06	2	1	1	2	1	
11	F	13,4	2	1	3	2	5	
12	R	11,34	2	2	3	2	5	
13	B	2,06	3	2	2	1	3	ST3
14	B	3,09	3	2	4	1	3	ST5
15	R	1,03	3	2	6	5	3	
16	B	2,06	3	2	7	1	3	
17	B	4,12	3	5	5	1	2	
18	R	1,03	4	2	6	5	3	ST5
19	R	3,09	4	2	6	5	4	
20	R	1,03	4	2	9	5	4	
21	R	3,09	4	3	9	2	4	
22	R	1,03	4	3	9	3	3	ST4
23	R	3,09	4	4	6	4	4	ST5
24	F	4,12	4	4	6	5	4	ST5
25	F	12,37	4	4	8	5	1	ST5
26	R	1,03	4	5	4	1	2	ST2
27	R	1,03	4	6	6	3	3	ST4
28	R	5,15	4	6	6	5	4	ST5
29	R	1,03	4	6	7	3	3	ST4
30	R	1,03	5	2	2	1	2	ST3
31	B	1,03	5	3	7	3	3	ST4
32	B	1,03	5	6	7	1	2	ST3
33	B	1,03	5	6	7	3	3	ST4

**GRUPO 1: Incluye 1 complejo ST**



SUPERGRUPO F: EUROPEO

**GRUPO 2: Incluye 4 complejos ST**

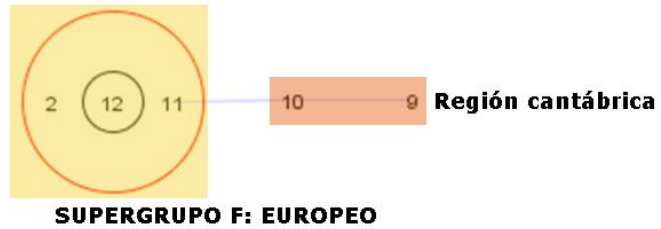


CEPAS RECOMBINANTES: SIMILITUD CON SUPERGRUPO F

Tabla 6: Distintos ST descritos en los individuos analizados, así como su frecuencia. Nótese la clasificación de estos en tres grandes grupos: cepas adscritas al supergrupo F ("F"), aquellas adscritas al supergrupo B ("B"), y otra serie marcadas como "R", en las que se han observado posibles eventos de recombinación entre supergrupos, según los datos suministrados por el software *RPD4* (Martin *et al.*, 2010b) (ver sección "Recombinación entre cepas"). Se señalan en rojo aquellos ST cuya frecuencia es mayor al 5% de los casos analizados. El código de colores coincide con los distintos ST señalados en la fig. 43 (siguiente página) y cuya miniatura aparece debajo. Estos indican los *loci* compartidos entre el ST ancestro (situado en el centro de los círculos de la Fig. 45) y que presenta todos sus alelos coloreados en la Tabla, y el resto de ST considerados miembros del mismo complejo ST. Por ejemplo los Cp\_ST5 (derivado) y Cp\_ST6 (ancestro) comparten los alelos coloreados en azul. Según nos alejamos del ancestro de cada complejo (estas relaciones más lejanas se aprecian mejor en la Fig. 45), los distintos ST compartirán un número menor de alelos respecto al alelo ancestral, y aparecerán alelos nuevos. Estos casos afectan al Complejo Cp\_ST1, con los Cp\_ST 9 y Cp\_10, que si bien comparten alelos con el ancestro, presentan alelos propios (naranja). También ocurre en el caso del complejo Cp\_ST3, con los alelos coloreados de azul oscuro en los Cp\_ST30 y Cp\_ST32. Finalmente en el caso de los Cp\_ST25 y Cp\_ST4, con los alelos coloreados en rosa

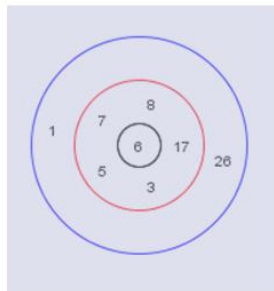
Fig. 45: (siguiente página) Clasificación de los distintos ST en grupos y complejos ST. En la tabla previa puede observarse el archivo alélico asociado a cada ST, así como su frecuencia en los individuos analizados. En este gráfico pueden observarse las asociaciones entre STs. El esquema presenta un ST ancestral en el centro del círculo, y alrededor de éste los distintos ST asociados. Según nos alejamos del ST ancestral se reduce el número de alelos compartidos, e incluso aparecen otros nuevos. Estas cepas ancestrales coinciden en algunos casos con las cepas más frecuentes en la población, a excepción del Cp\_ST25 (rosa), extremadamente frecuente en el Sistema Central ibérico y que se emplaza como ST derivado, en la periferia de uno de los complejos (rojo). El primer grupo englobaría a varias ST detectadas en poblaciones no ibéricas (y la población granadina de Bubión) cuyo ST ancestral sería el Cp\_ST12. Aparecerían relacionados con este complejo ST aquellos ST detectados en la región cantábrica. En el segundo grupo, más heterogéneo, pueden observarse cuatro complejos ST relacionados. El primero de ellos, englobaría a los ST caracterizados como pertenecientes al supergrupo B, cuyo ancestro sería el Cp\_ST6. Un segundo grupo engloba cepas recombinantes descritas principalmente en la zona híbrida y que estarían relacionadas con el supergrupo B, cuyo ST ancestro sería el Cp\_ST13. El tercer grupo, engloba cepas recombinantes, relacionadas en este caso con el supergrupo F, con centro en el ST29, y finalmente, el último complejo incluiría STs clasificadas como pertenecientes al supergrupo F y que se han descrito en el centro de la Península Ibérica, así como cepas recombinantes, muy relacionadas con estas últimas.

**GRUPO 1: Incluye 1 complejo ST**

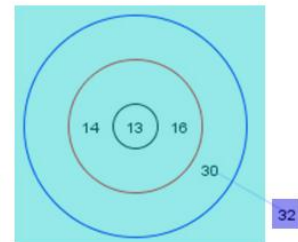


**GRUPO 2: Incluye 4 complejos ST**

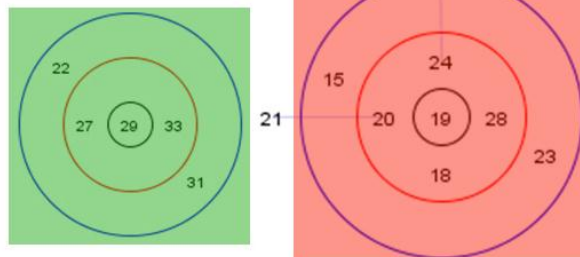
**SUPERGRUPO B**



**CEPAS RECOMBINANTES:  
SIMILITUD CON SUPERGRUPO B**



**SUPERGRUPO F:  
P. IBÉRICA**



**CEPAS RECOMBINANTES:  
SIMILITUD CON SUPERGRUPO F**

Fruto de este estudio pueden detectarse al menos 5 complejos ST diferentes (Tabla 6 y Fig. 45). El primero de ellos incluye las cepas pertenecientes al supergrupo F que se han detectado en la Europa no ibérica (naranja suave). A ellas se asocian las cepas detectadas en la cornisa cantábrica (naranja oscuro). El segundo grupo puede subdividirse en 4 complejos ST. El primero incluye a las distintas ST pertenecientes al supergrupo B (azul oscuro). El segundo, a las cepas pertenecientes al supergrupo F, o recombinantes con similitud por el supergrupo F (verde y rojo). En este último grupo localizamos a la Cp\_ST25 (rosa), predominante en el centro de la Península Ibérica. Por otro lado, se agrupan cepas recombinantes similares al supergrupo B (azul claro).

### *Divergencia entre cepas F.*

Se han calculado las distancias genéticas corregidas mediante los modelos de *JC* y *GTR* (Lemey *et al.*, 2009) entre las distintas cepas analizadas pertenecientes al supergrupo F (ver Tablas B12 y B13 del anexo B). Cabe destacar la existencia de dos grupos, soportados por la filogenia (ver Fig. 46): Las secuencias correspondientes a la Cp\_ST10 y Cp\_ST11, detectadas principalmente en las poblaciones europeas, así como en la cornisa cantábrica, se agruparían frente a las cepas Cp\_ST24 y Cp\_ST25, descritas en la zona centro de la Península y ciertas poblaciones híbridas.

Al igual que ocurría en las estimas de tiempo de divergencia en los *loci* individuales, la estimación de los tiempos de divergencia entre los complejos ST descritos puede ser problemática debido a la ausencia de datos paleontológicos o geológicos que nos permitan datar nuestros árboles filogenéticos.

Para ello, emplearemos la aproximación de Raychoudhury *et al.* (2009) que permite emplear relojes moleculares bacterianos como una estimación de estas tasas de divergencia. Dichos estudios calculan una tasa de divergencia sinónima en torno a 0,90% por millón de años en bacterias, si bien estas estimas pueden variar en los distintos linajes bacterianos, por lo que deben emplearse con precaución.

Para estimar la divergencia entre cepas, se utiliza la tasa de sustituciones sinónimas *ks-JC* (Nei & Gojobori, 1986). Los detalles pueden consultarse en las Tablas B11 y B12 del anexo B. Las estimas realizadas indican que las cepas F presentes en Eslovenia (Cp\_ST11) y Navafría (Sistema Central) (Cp\_ST25), divergieron hace aproximadamente unos 34.200 años. A su vez, supone una divergencia entre las cepas F detectadas en el norte de España (Cp\_ST10) y esta última del Sistema Central (Cp\_ST25) de aproximadamente 26.700 años. Una menor

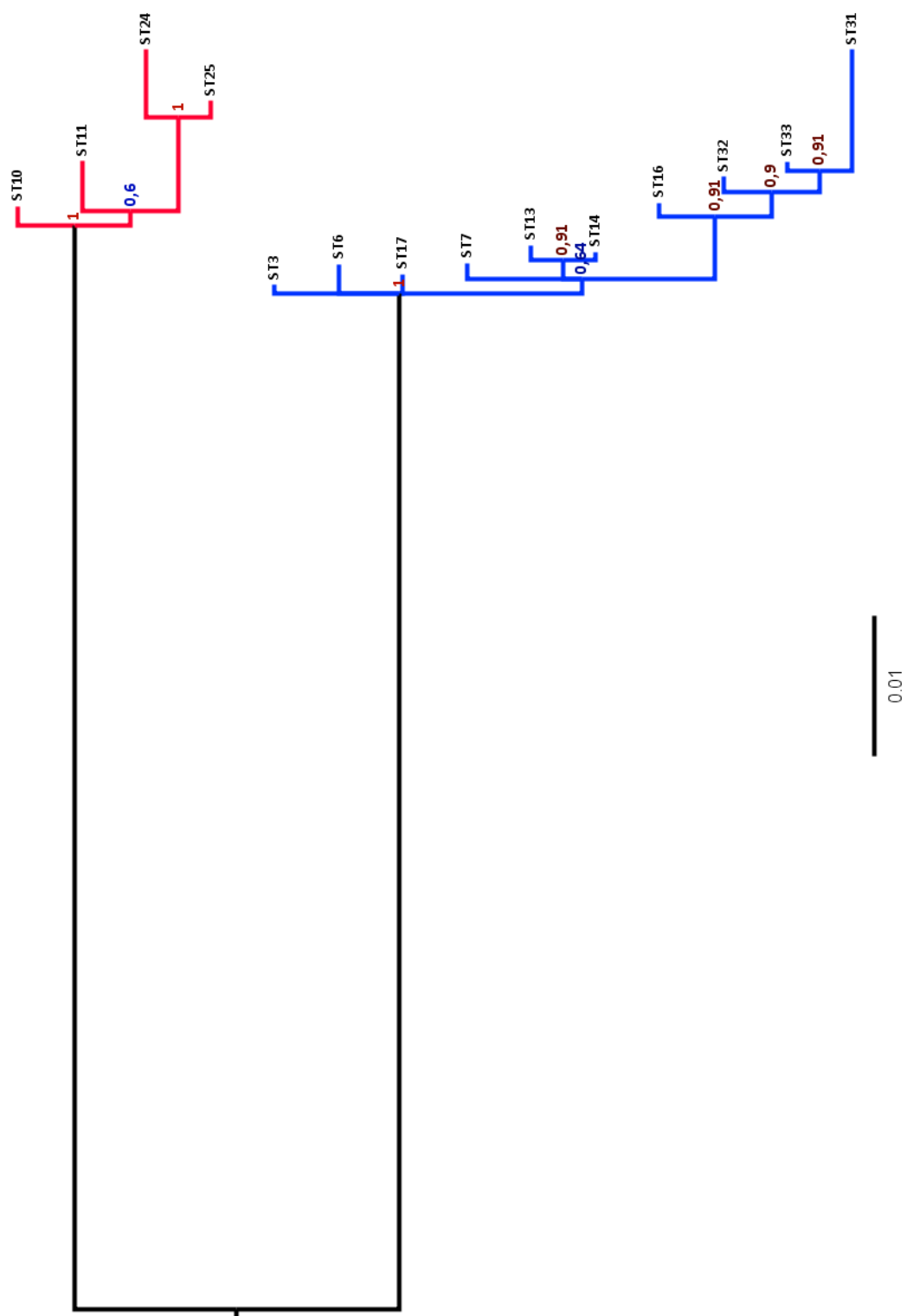


Fig. 46: Árbol filogenético no enraizado de los distintos Cp\_ST detectados en *C. parallelus* (excluidos los ST descritos como recombinantes, ver siguiente sección), obtenido mediante inferencia bayesiana.

divergencia se observa entre las cepas F detectadas en la zona híbrida (Cp\_ST24) y el Sistema Central (Cp\_ST25), que parecen haber divergido hace aproximadamente unos 14.500 años.

A la hora de discutir estos datos habrá que tener en cuenta que el aislamiento geográfico y ecológico actual entre algunas poblaciones, por ejemplo, aquellas situadas en el Sistema Central, y Pirineos, no siempre ha sido así, debido a los cambios climáticos y ecológicos ocurridos en la Península Ibérica en los últimos 10.000 años (ver discusión).

### *Divergencia entre cepas B.*

En cuanto a las distancias génicas estimadas entre las distintas STs adscritas al supergrupo B de *Wolbachia*, cabe destacar la similitud existente entre las distintas cepas. Si bien en el supergrupo B existe un mayor número de ellas (definidas como la combinación única de alelos), dichas cepas son extremadamente similares. La distancia máxima se encuentra entre la cepa Cp\_ST31 y el resto. Salvo este caso, la distancia entre cepas no supera el valor de 0,008, y en la mayoría de los casos es muy inferior (ver Tablas B14 y B15 del anexo B).

Siguiendo la metodología anterior, podemos estimar las tasas de divergencia sinónima entre las distintas STs clasificadas dentro del supergrupo B. A partir de los datos que se muestran en la Tabla B15 del anexo B, se puede inferir que cepas tan distantes geográficamente como las Cp\_ST3 y Cp\_ST6, divergieron hace aproximadamente 2500 años. Esta separación aumenta si comparamos las cepas detectadas en la zona híbrida (Cp\_ST14, Cp\_ST16) y la cepa Cp\_ST6 (Inglaterra, Alpes...). Éstas divergieron hace unos 5.000-7.000 años.

Cabe destacar la divergencia entre las Cp\_STs 31, 32 y 33, respecto al resto de cepas. Éstas habrían divergido del resto hace aproximadamente 8.000-14.000 años.

Esta mayor divergencia entre las cepas Cp\_ST31, Cp\_ST32 y Cp\_ST33, y el resto de cepas B, podría deberse a eventos de recombinación no detectados mediante el método MaxChi (nivel de significación  $p > 0,01$ ), pero que podrían estar afectando a estas secuencias. De hecho, condiciones menos restrictivas en los análisis detectarían más eventos de recombinación entre estas cepas, si bien su nivel de significación no sería suficiente para aceptarlos estadísticamente (lo que no descarta completamente que ocurran y, en su caso, su importancia biológica). De confirmarse esto, explicaríamos el incremento del tiempo de divergencia detectado entre estas cepas como un artefacto de las estimas inducido por los procesos de recombinación con cepas más lejanas.

### *Recombinación entre cepas.*

Con el fin de describir y explicar la diversidad genética detectada en las cepas de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus*, se han estudiado los posibles fenómenos de recombinación entre STs. Este estudio pretende describir los distintos STs parentales y recombinantes, con el fin de explicar el origen de la gran diversidad detectada.

Los distintos test implementados en el software *RDP4* (Martin *et al.*, 2010b) nos han permitido detectar con una confianza de  $p > 0,01$ , 14 STs parentales: Cp\_ST3, Cp\_ST6, Cp\_ST7, Cp\_ST10, Cp\_ST11, Cp\_ST13, Cp\_ST14, Cp\_ST16, Cp\_ST17, Cp\_ST24, Cp\_ST25, Cp\_ST31, Cp\_ST32 y Cp\_ST33. El resto de cepas o STs pueden explicarse por recombinación entre dos de ellas.

Sin embargo, los sucesos de recombinación detectados no implican por igual a las STs parentales. Se han observado eventos de recombinación entre los parentales Cp\_ST25 (supergrupo B) y Cp\_ST17 (supergrupo F); entre los parentales Cp\_ST25 (supergrupo F) y Cp\_ST6 (supergrupo B), y, finalmente, entre las Cp\_ST24 (supergrupo F) y Cp\_ST13 (supergrupo B). La distribución de estas cepas parentales, así como la de sus recombinantes, será tratada más adelante, si bien cabe anticipar que un gran número de recombinantes detectado en la zona híbrida pueden explicarse como consecuencia de la recombinación de cepas parentales que se localizan en poblaciones europeas y españolas, respectivamente.

Debido a los artefactos que genera en la inferencia filogenética la presencia de recombinantes (Posada *et al.*, 2002), éstos fueron eliminados del análisis, reconstruyéndose la filogenia de los ST parentales. De este modo, se pudo caracterizar el supergrupo al que pertenecían cada una de las ST parentales detectadas (ver Fig. 46).

Tras este análisis, y debido a la elevada tasa de recombinación, se procedió a la caracterización de las STs detectadas en tres clases, correspondientes a los supergrupos F y B, así como a cepas recombinantes (R). Esta categorización viene dada por la imposibilidad de asignar a dichos supergrupos las cepas recombinantes. De esta forma, las Cp\_ST 3, 6, 7, 13, 14, 16, 17, 31, 32 y 33 pertenecerían claramente al supergrupo B, mientras que las Cp\_ST 10, 11, 25 y 24 lo harían al supergrupo F. El resto de STs quedarían clasificadas como cepas recombinantes (Tabla 6).

Hay que mencionar que los alelos detectados en estas cepas “recombinantes” no siempre son idénticos a los alelos del supergrupo F o B detectados en poblaciones puras. Esto implica que tras este proceso de recombinación entre cepas, ha existido un proceso de acumulación de nuevas mutaciones que permiten diferenciar a estos alelos de aquellos detectados en cepas consideradas parentales, tanto pertenecientes al supergrupo F como al

supergrupo B, y que se detectan de forma preferencial en poblaciones puras del hospedador. A su vez, no pueden descartarse eventos de recombinación entre cepas recombinantes (Fig. 47).

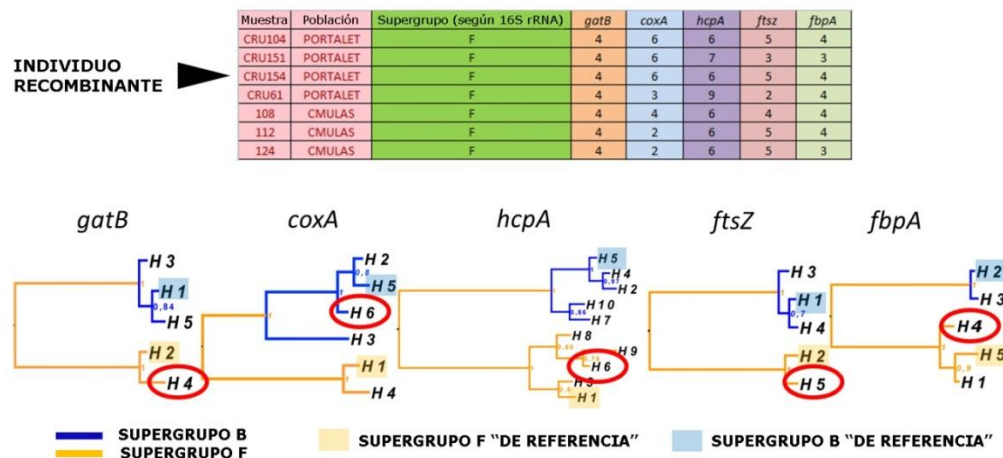


Fig. 47: Esquema mostrando un ejemplo de cepa recombinante. Nótese la adscripción del alelo H6 del gen *coxA* (detectado en este individuo) al supergrupo B, pese a que el resto de alelos permitirían caracterizar a esta cepa como perteneciente al supergrupo F.

#### 28.3.4 Filogenia de *Wolbachia* a partir de una aproximación Multilocus: Filogenia de los cinco *loci* concatenados.

El análisis filogenético de los cinco *loci* concatenados fue realizado a su vez mediante ambas metodologías, ML e IB, empleándose los paquetes informáticos previamente descritos para cada caso. Debido a los eventos de recombinación detectados previamente, en el análisis se excluyeron las STs recombinantes, según la clasificación indicada anteriormente. Este procedimiento fue esencial para la construcción de la filogenia correspondiente, debido a los artefactos que los procesos de recombinación producen en la topología de los árboles filogenéticos (Posada *et al.*, 2002).

La reconstrucción filogenética de las cepas no recombinantes de los supergrupos F y B, permitió corroborar su inclusión en los supergrupos F y B previamente asignados a partir de los *loci* de forma independiente. La selección de las cepas empleadas para la reconstrucción se basó en la selección de Doudoumis *et al.* (2012), con el fin de evitar los artefactos producidos tanto por las cepas recombinantes descritas en otros organismos, así como por la “atracción de ramas largas”.

*Inferencia bayesiana.*



En este caso, se procedió a la subdivisión del archivo, de modo que se asignó a cada uno de los *loci* el modelo evolutivo adecuado, inferido en las secciones previas, mediante el software *jModeltest* (Posada, 2008). De igual modo, se utilizaron a modo de “priors” las estimas para los distintos parámetros calculadas por este software (Fig. 48).

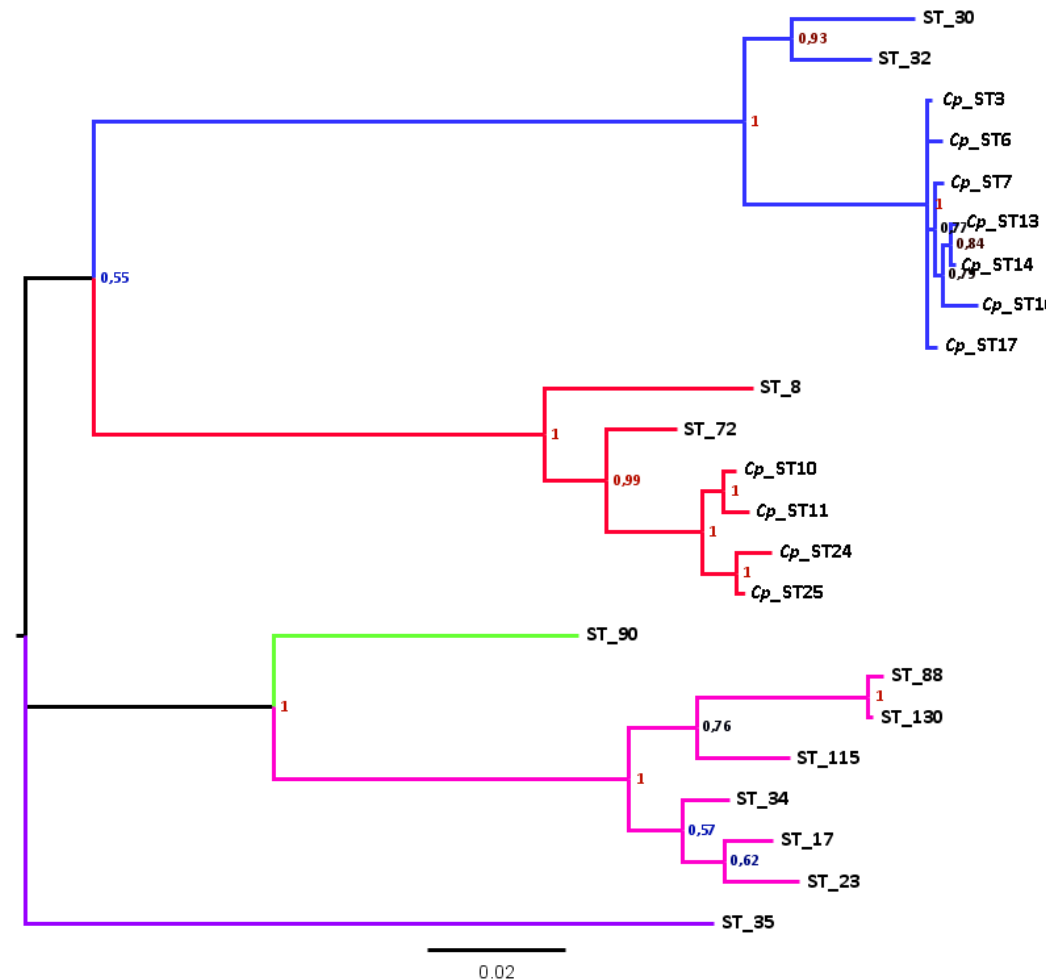


Fig. 48: Árbol filogenético no enraizado de los distintos ST detectados en *C. parallelus* (excluidos los ST descritos como recombinantes), obtenido mediante inferencia bayesiana. Los alelos descritos en este ortóptero son denominados como Cp\_ST(número). El resto de ST se nombra según la nomenclatura oficial, y están disponibles en las bases de datos del MLST. El código de colores significa supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores.

### *Máxima Verosimilitud.*

En este caso, y dada la imposibilidad de asignar distintos modelos evolutivos a cada uno de los *loci* concatenados, se empleó el modelo evolutivo *GTR+I+G* implementado en el software *RaxML* (Stamatakis, 2006b) (Fig. 49).

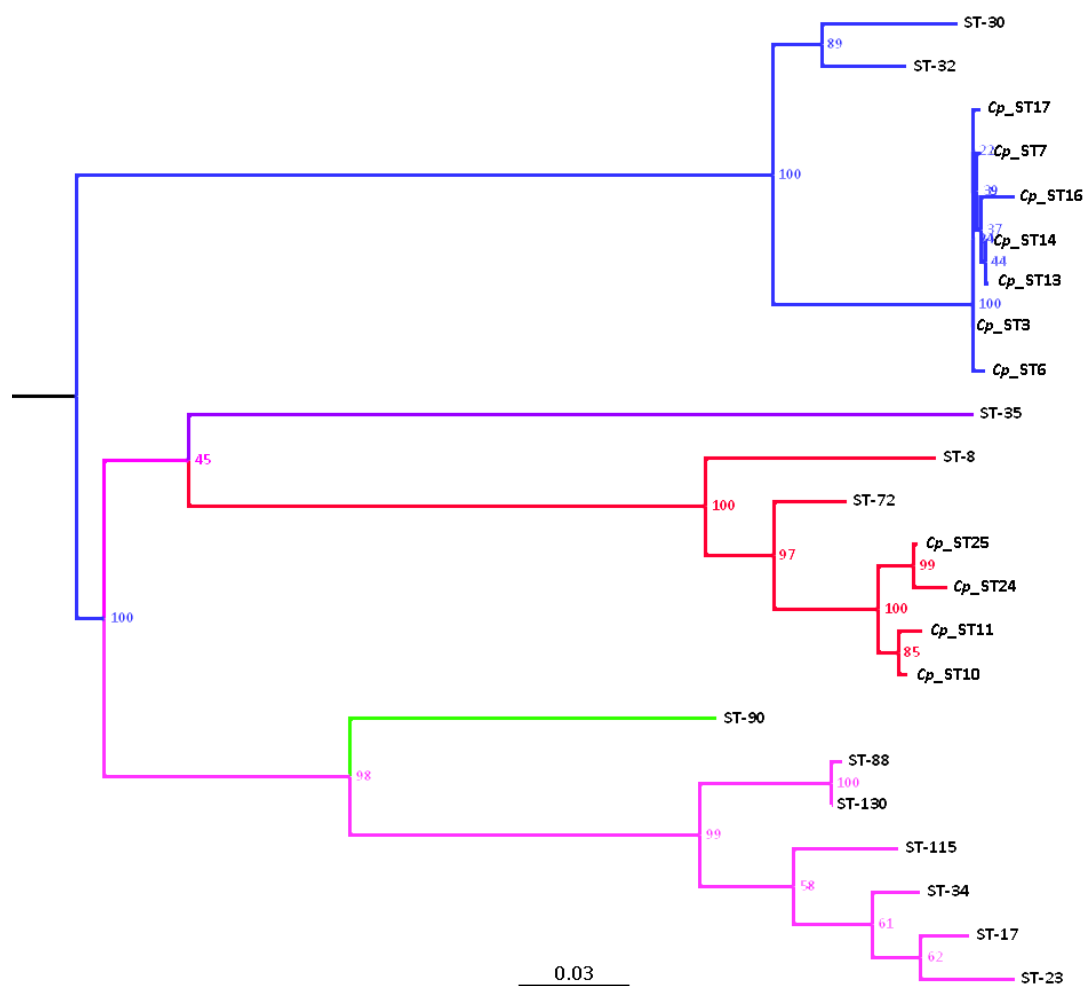


Fig. 49: Árbol filogenético no enraizado de los distintos ST detectados en *C. parallelus* (excluidos los ST descritos como recombinantes), obtenido mediante máxima verosimilitud. Los alelos descritos en este ortóptero son denominados como Cp\_ST(número). El resto de ST se nombra según la nomenclatura oficial, y están disponibles en las bases de datos del MLST. El código de colores significa supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos.

### Comparación de topologías.

Ambos árboles fueron equivalentes exceptuando la posición de ST-35, perteneciente al supergrupo D. La posición de este grupo no se pudo resolver mediante IB, existiendo una politomía en la base del árbol no enraizado. En el segundo caso, ML, se propuso la relación entre el supergrupo D y el supergrupo F, si bien, la resolución de este clado fue pobre, por lo que no debe ser considerada.

## 28.4 Clasificación de cepas, acorde con el gen *wsp*.

### *Filogenia basada en el gen wsp.*

Baldo *et al.* (2005; 2006a; 2006b) propusieron un sistema complementario, pero no alternativo, al MLST. Este sistema, basado en el gen *wsp*, permitiría una clasificación de cepas en base a la secuencia aminoacídica de una proteína de membrana (*Wolbachia Surface Protein*), caracterizada únicamente en esta “especie” bacteriana. Sin embargo, debido la alta tasa de mutación acelerada descrita en este *loci*, la estima de la divergencia entre cepas utilizando el reloj molecular anteriormente propuesto por no se considera adecuado para este gen (Raychoudhury *et al.*, 2009). A su vez, al detectarse altas tasas de recombinación entre supergrupos, los propios autores hacían constar que se trata de un método complementario, pero que no debe emplearse de forma aislada, a causa de los posibles artefactos causados por esta recombinación entre cepas. Los árboles correspondientes a los análisis de inferencia bayesiana y de máxima verosimilitud pueden consultarse en las figuras A15, A16 y A17 del anexo A.

La filogenia reconstruida apoya los resultados previos obtenidos mediante el resto de *loci*, de modo que pueden describirse fácilmente los alelos detectados en *C. parallelus* como pertenecientes al supergrupo B (azul), y F (rojo). Se han identificado 4 alelos adscritos al supergrupo F, que a su vez pueden clasificarse en dos grupos, los alelos H3 y H4, muy similares, y por otro lado, los H5 y H6. En cuanto al supergrupo B, se distinguen dos alelos, más distantes, denominados H1 y H2. Su distribución en las distintas poblaciones será analizada posteriormente.

### *Clasificación de los alelos descritos.*

Para ello, la secuencia aminoacídica de la proteína *wsp* a analizar se compara respecto a la detectada en la cepa *wMel*, seleccionándose la región correspondiente a los aminoácidos 252 a 22 (Baldo *et al.*, 2006). Dicha región se divide en cuatro regiones hipervariables o HVR consecutivas. Cada una de ellas presenta, sin embargo, regiones conservadas que permiten su alineamiento entre cepas y que se sitúan entre las HVR (Baldo *et al.*, 2005): HVR1 (aminoácidos 52-84), HVR2 (aminoácidos 85-134), HVR3 (aminoácidos 135-185) y HVR4 (aminoácidos 186-222).

Cada una de estas regiones aminoacídicas de secuencia única recibe un número, de modo que una cepa concreta quedaría definida por un conjunto de 4 números que caracterizarían sus 4 regiones hipervariables. Este sistema permite la caracterización de las

cepas bacterianas debido a la alta variabilidad detectada en este gen, y pese a su elevada recombinación (Baldo *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2006a; Baldo *et al.*, 2006b; Baldo & Werren, 2007).

Si analizamos las secuencias caracterizadas en individuos de *Chorthippus parallelus* infectados por *Wolbachia*, observamos 3 grandes grupos. Las regiones hipervariables de los alelos 1 y 2 coinciden con una identidad de incluso el 100%, en algunos casos, con otras HVR descritas en distintos organismos infectados por el supergrupo B (géneros *Nasonia*, *Tetranychus*, *Rhagoletis*, *Acraea*...). Las HVR de los alelos 3 y 4 se asemejan a los referidos en el género *Apoica* (Himenoptera), mientras que los HVR de los alelos 5 y 6 se asemejan a los HVR referidos en distintas especies del Género *Opisthophthalmus* (Scorpidae) (Baldo *et al.*, 2007). Los detalles pueden consultarse en la Tabla B16 del anexo B.

## **28.5 Filogeografía de *Wolbachia*.**

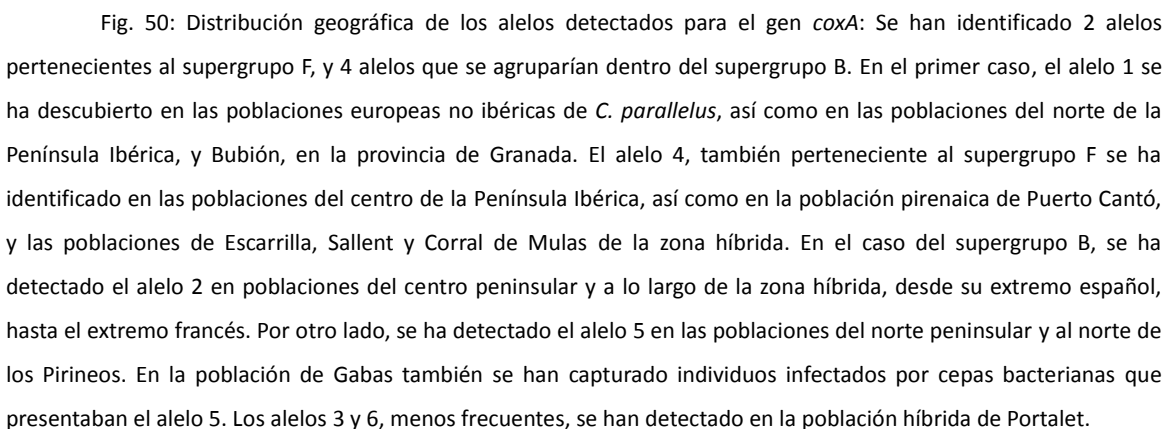
### **28.5.1 Localización geográfica de los alelos detectados para los distintos genes del sistema MLST.**

Los complejos ST caracterizados no se distribuyen aleatoriamente en las distintas poblaciones analizadas, sino que presentan una estructura poblacional muy concreta.

Dado que la caracterización de los complejos se ha realizado a partir de un muestreo particular de individuos (por ejemplo se han seleccionado 5 especímenes previamente caracterizados como infectados por el supergrupo F (independientemente de las frecuencias de F en esa población)), la estima de las frecuencias de cada ST en cada población debe tener en cuenta la frecuencia de este supergrupo en la población concreta, y a su vez , la frecuencia de este ST concreto de los “n” individuos caracterizados.

Como se ha comentado previamente, este análisis debe considerarse con precaución debido al “n” muestral, pero resulta informativo sobre la prevalencia de un determinado alelo en cada población analizada. En general se observa un patrón, concordante entre los distintos genes, en el cual se puede distinguir un grupo B homogéneo, con variantes puntuales asociadas a la zona híbrida. Por otro lado, en el caso del supergrupo F, se distinguen alelos distintos en las poblaciones del Sistema Central y la vertiente española del Pirineo, respecto a los alelos detectados en las poblaciones europeas no ibéricas, Bubión y la cornisa cantábrica. En las poblaciones híbridas aparecen de forma recurrente nuevas variantes. La distribución de los distintos alelos se muestra en las Fig. 50 a 56.





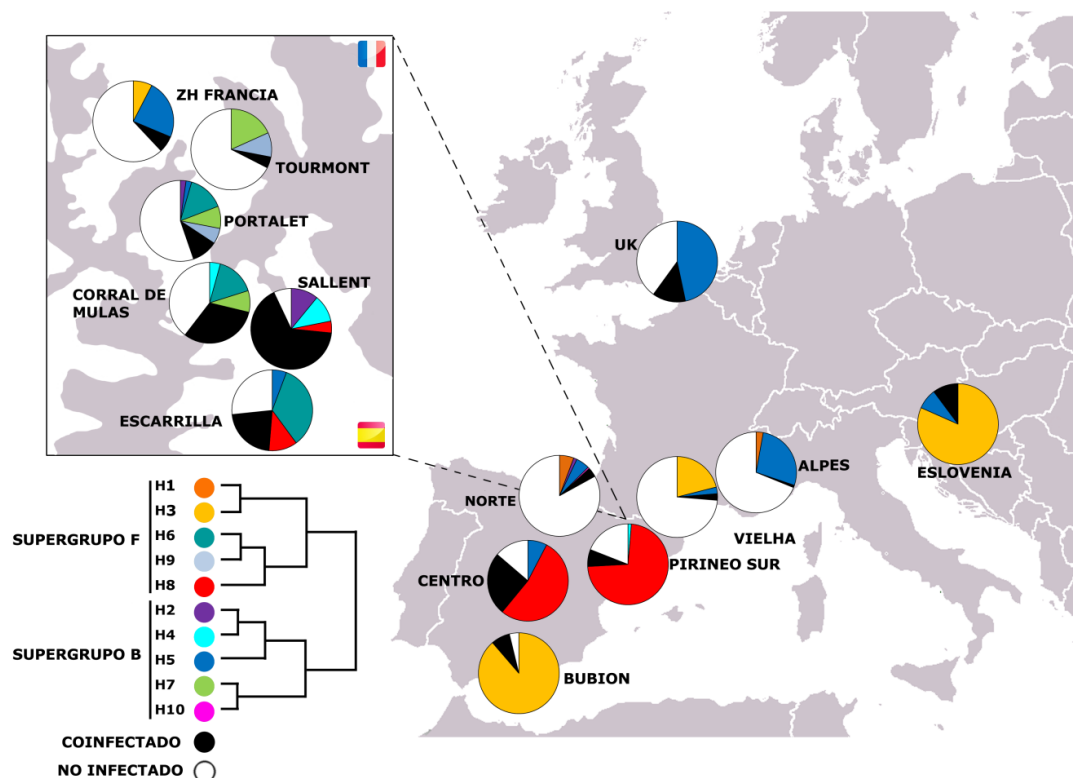


Fig. 51: Distribución geográfica de los alelos detectados para el gen *hcpA*: Hemos descrito 5 alelos pertenecientes al supergrupo F, y 5 alelos que se agruparían dentro del supergrupo B. En el primer caso el alelo 1 se ha encontrado en las poblaciones no ibéricas de *C. parallelus*, así como en Bubión, en la provincia de Granada. El alelo 8, también perteneciente al supergrupo F, se ha identificado en las poblaciones del centro de la Península Ibérica, así como en la población pirenaica de Puerto Cantó, y las poblaciones de Escarrilla y Sallent de la zona híbrida. En las poblaciones del norte se ha descubierto el alelo 3, relacionado con el alelo 1, descrito en el resto de Europa. Otros alelos menos frecuentes se han detectado en las poblaciones de la zona híbrida. Destaca el caso del alelo 6, identificado en Escarrilla y en Corral de Mulas. En el caso del supergrupo B, se ha descrito el alelo 5 en prácticamente todas las poblaciones estudiadas, sin embargo este alelo es sustituido por otros menos frecuentes en las poblaciones de la zona híbrida. El alelo 4, también ha sido hallado en frecuencias bajas en las poblaciones de Navarra (Sistema Central) y Pto. Cantó (Pirineos).

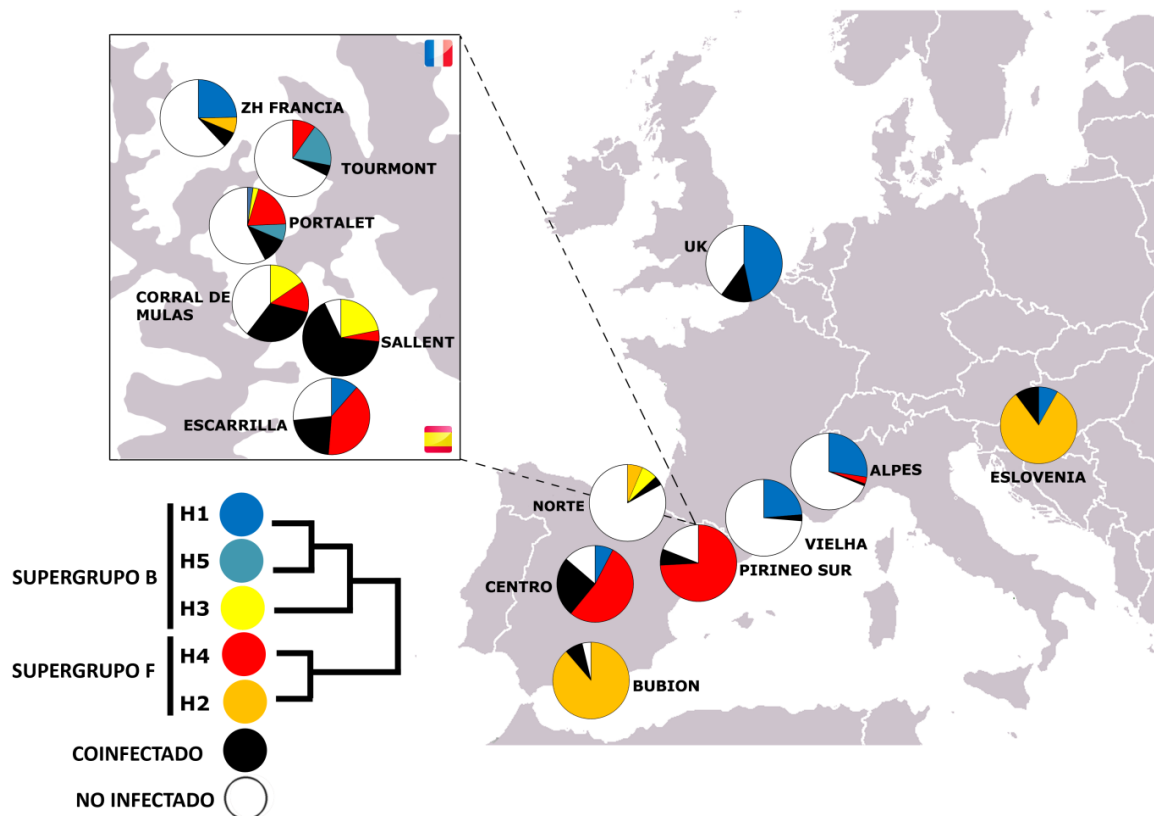


Fig. 52: Distribución geográfica de los alelos detectados para el gen *gatB*: Se han identificado 2 alelos pertenecientes al supergrupo F, y 3 alelos que se agruparían dentro del supergrupo B. En el primer caso el alelo 2 se ha descrito en las poblaciones europeas de *C. parallelus*, así como en Bubión, en la provincia de Granada y en las poblaciones de la cornisa cantábrica. También ha sido identificado en la población de Gabas, en el extremo francés de la zona híbrida. El alelo 4, también perteneciente al supergrupo F se ha detectado en las poblaciones del centro de la Península Ibérica, así como en la población pirenaica de Puerto Cantó, y las poblaciones de Escarrilla, Sallent, Corral de Mulas y Portalet de la zona híbrida. En el caso del supergrupo B, se descubrió el alelo 1 en prácticamente todas las poblaciones estudiadas, sin embargo este alelo es sustituido por los alelos 3 y 5 en las poblaciones de la zona híbrida: Sallent, Corral de Mulas y Portalet. El alelo 5, también ha sido detectado en la cornisa cantábrica.

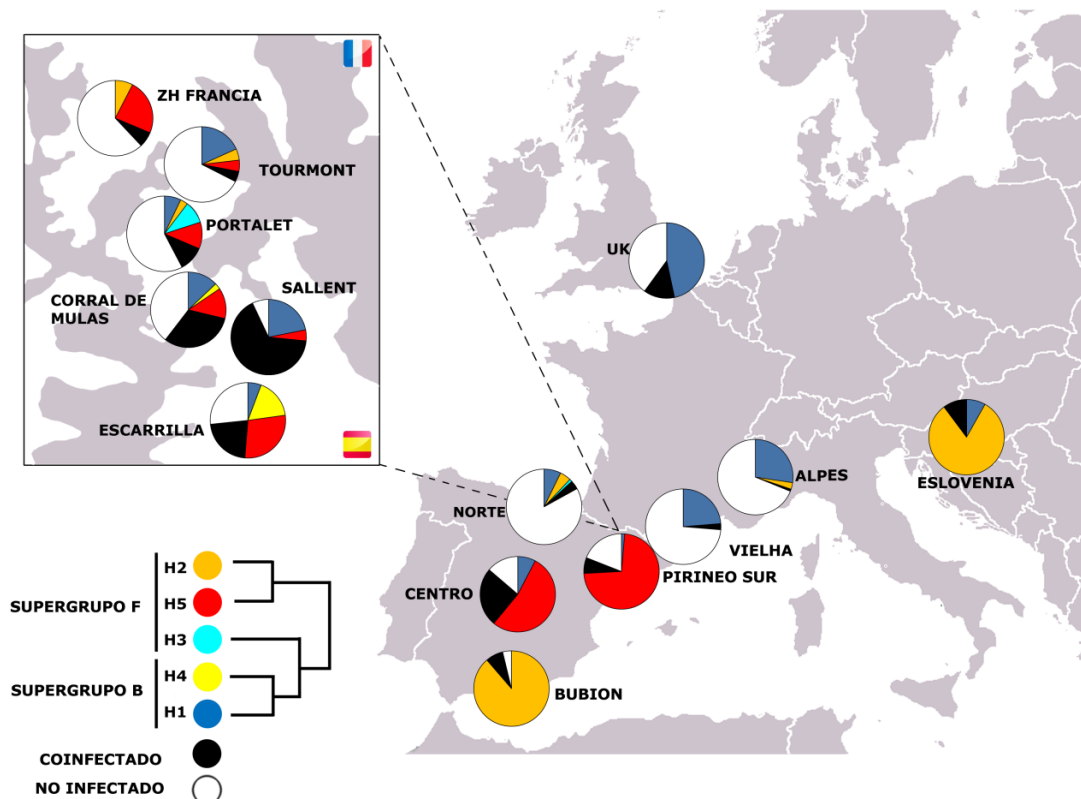


Fig. 53: Distribución geográfica de los alelos detectados para el gen *ftsZ*: Hemos descrito 2 alelos pertenecientes al supergrupo F, y 3 alelos que se agruparían dentro del B. En el primer caso el alelo 2 se ha identificado en las poblaciones europeas no ibéricas de *C. parallelus*, en las poblaciones de la cornisa cantábrica, en la población de Bubión (Granada) y en Gabas (lado francés de la zona híbrida). El alelo 5, al igual que ocurría en casos previos, se ha detectado en las poblaciones del centro de la Península Ibérica, así como en la población pirenaica de Puerto Cantó. De igual modo puede encontrarse en las poblaciones de Escarrilla, Sallent, Corral de Mulas y Portalet (zona híbrida). En el caso del supergrupo B, se ha detectado el alelo 1 en prácticamente todas las poblaciones estudiadas. El alelo 3 puede detectarse tanto en Portalet como en la cornisa cantábrica. El alelo 4 se ha descrito en las poblaciones de Escarrilla y Corral de Mulas.



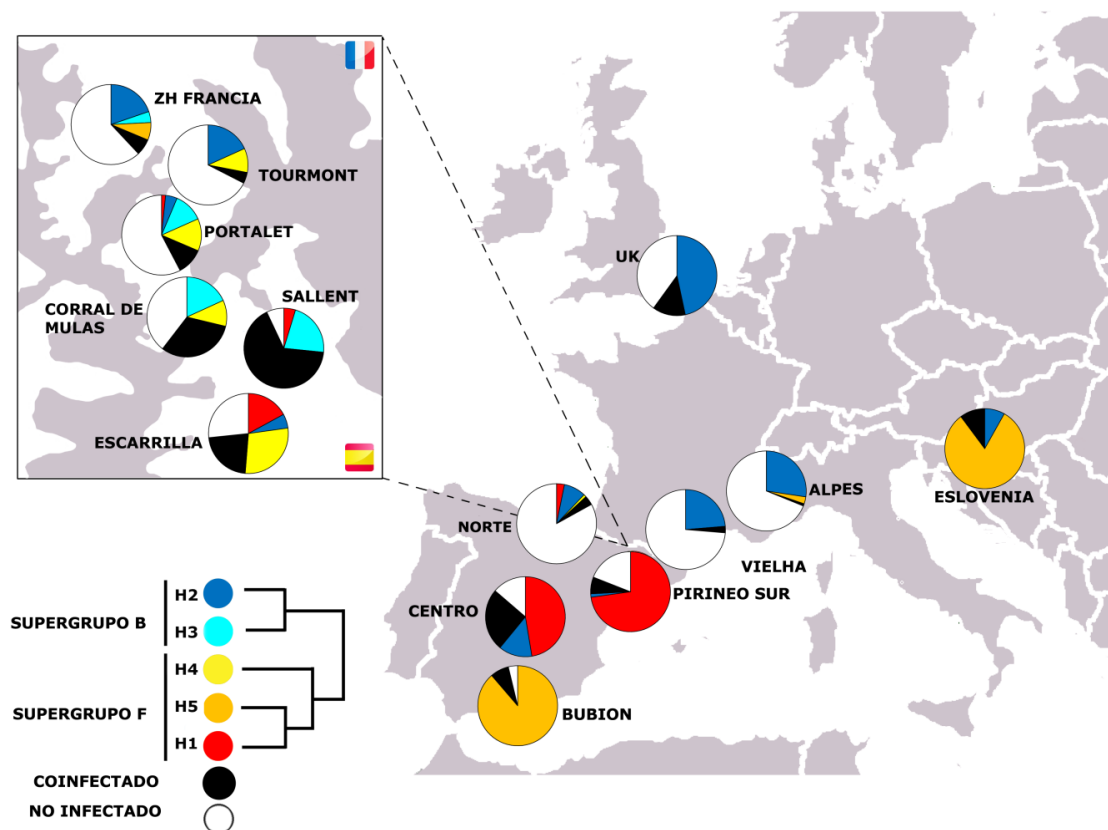


Fig. 54: Distribución geográfica de los alelos detectados para el gen *fbpA*: Se han descrito 3 alelos pertenecientes al supergrupo F, y 2 alelos asociados al supergrupo B. En el caso del supergrupo F, se ha detectado el alelo 1 en las poblaciones del centro de la Península, así como en la zona del Cantábrico, y la población de Escarrilla (extermo español de la zona híbrida). El alelo 5 es predominante en las poblaciones europeas al norte de los Pirineos, incluyendo Gabas. Por otro lado, se ha identificado el alelo 4 en Gabas y Portalet (zona híbrida). Respecto al supergrupo B, se ha detectado el alelo 2 en casi todas las poblaciones muestreadas, a excepción de Sallent, Corral de Mulas, Escarrilla y el área cantábrica, donde también se ha descrito el alelo 3.

## 28.5.2 Detección de los distintos complejos.

En la siguiente figura pueden observarse las frecuencias relativas de los distintos ST detectados en las poblaciones muestreadas. Cabe destacar la existencia de tres grandes grupos de STs, pertenecientes al supergrupo F, B y recombinantes. Dentro de los ST del supergrupo F, se mantiene el patrón observado previamente, encontrándose el Cp\_ST25 y su variante Cp\_ST24 en la zona centro peninsular, frente al Cp\_ST11 y su variante Cp\_ST10 característicos de las poblaciones europeas norteñas, cantábricas y la población de Bubión (Sierra Nevada). Respecto al supergrupo B, el Cp\_ST6 está presente en un gran número de poblaciones, así como varias variantes relacionadas. Por otro lado, cabe destacar la presencia de múltiples ST recombinantes en las poblaciones de la zona híbrida pirenaica, así como poblaciones cercanas, detectándose un mayor número de variantes en la zona central de la zona híbrida, incluyendo las poblaciones de Corral de Mulas, Portalet y Tourmont.

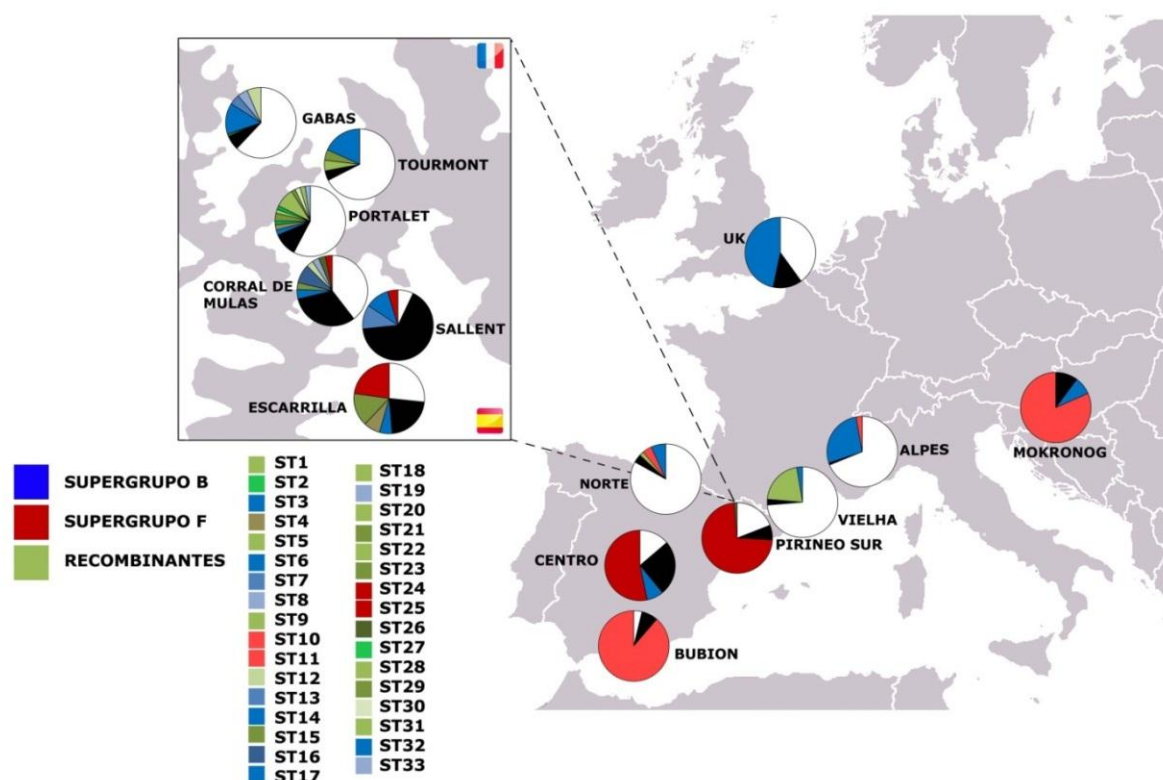


Fig. 55: Distribución geográfica de los distintos ST descritos. Donde los ST en tonos azules, están adscritos al supergrupo B, aquellos en tonos rojos, al supergrupo F, y aquellos que están en tonos verdes, representan cepas recombinantes. Nótese el incremento de ST recombinantes en la zona híbrida de *C. parallelus*.

### 28.5.3 Localización geográfica de los alelos del gen *wsp*.

Como en los casos anteriores, se analizó la estructuración filogeográfica de las cepas detectadas (figuras A15 a A17 del anexo A). Los alelos del gen *wsp* no se distribuyen aleatoriamente en las distintas poblaciones analizadas, presentando estructuración poblacional similar a la que mostraban otros marcadores (ver figuras 50-54).

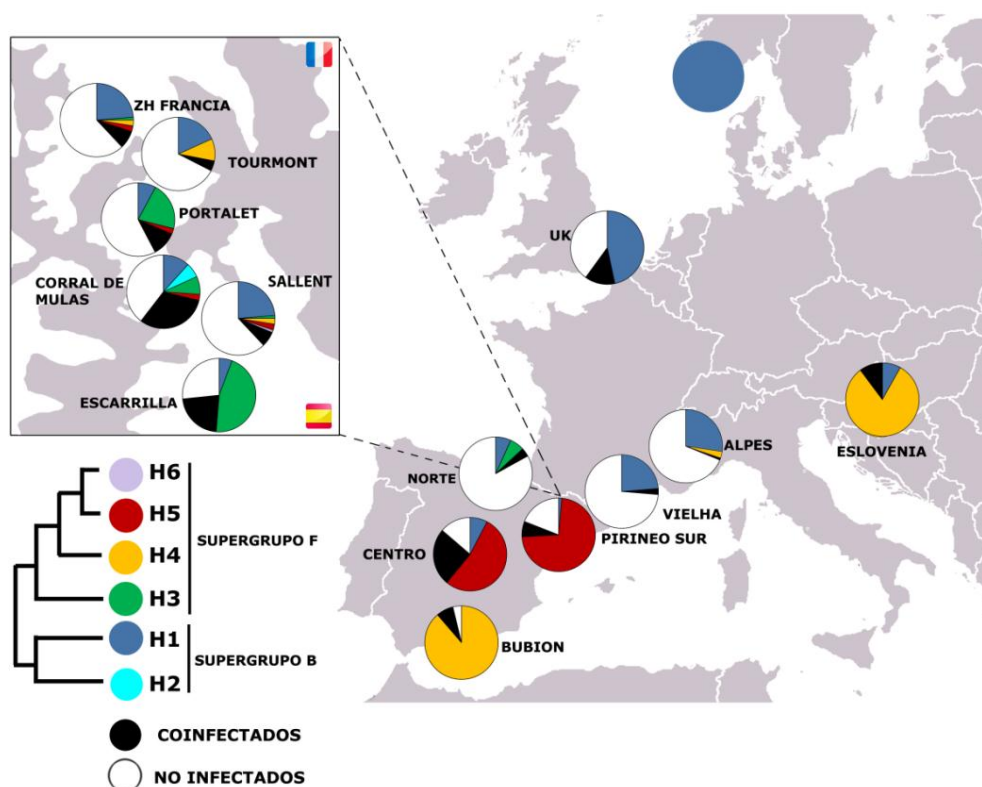


Fig. 56: Distribución de los alelos descritos para el gen *wsp* de *Wolbachia*. Se han descrito 2 alelos para el supergrupo B. El alelo 1 se ha detectado en todas las poblaciones analizadas donde se han capturado individuos infectados por este supergrupo, incluyendo poblaciones tan distantes como Navafría (Sistema Central, España) y las poblaciones noruegas o eslovenas. El alelo 2 por su parte, ha sido identificado únicamente en un individuo de la población de Corral de Mulas, por lo que este dato debe tomarse con precaución. Por otro lado, se han detectado 4 alelos adscritos al supergrupo F. El alelo 3 aparece en varias poblaciones pirenaicas de la zona híbrida, así como en el norte de la Península. El alelo 4 ha sido caracterizado en Eslovenia, Alpes y algunas poblaciones pirenaicas, así como en Bubión (Granada), confirmando el atípico patrón de esta última población. Finalmente el alelo 5 parece propio del centro de la Península Ibérica, donde es el único presente. También se ha detectado en otras poblaciones pirenaicas como Puerto Cantó y, en menor proporción, en las poblaciones híbridas de Sallent de Gállego, Corral de Mulas, Portalet o L'Hermine. El alelo 6 sólo ha sido descrito en la población de Sallent de Gállego.

## 28.6 Estructura genética de las poblaciones.

### *Análisis basado en el archivo alélico de cada población.*

En primer lugar se procedió a la asignación de los distintos individuos a las K poblaciones inferidas, en base a los alelos descritos en cada uno de los 5 *loci* analizados por el MLST.

El algoritmo implementado permite inferir la existencia de varias poblaciones genéticas, asignando a los distintos individuos a cada población inferida. El algoritmo de agrupación (basado en un modelo matemático concreto definido por el usuario) infiere la estructura genética de la muestra, utilizando como datos de partida los genotipos de los individuos. Esta metodología nos permite demostrar si existe “estructura poblacional”, identificando distintas poblaciones genéticas bacterianas. El algoritmo asume un número “K” de poblaciones genéticas, en función de la frecuencia de alelos característica de cada una de ellas. Posteriormente, los individuos se asignan a las poblaciones propuestas (K) y se calcula la probabilidad de que dicha asignación se ajuste a los datos experimentales.

Siguiendo la metodología propuesta por Evanno *et al.* (2005), se considera que el valor óptimo de K, será aquel que maximiza la probabilidad de obtener los datos para un valor de K determinado. Esto es, maximiza el valor de  $L(K)=Pr(X|K)$ . Para estimar el K óptimo, calculan y representan los valores de  $L'(K)$ ,  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ . Siendo  $L'(K) = L(K)-L(K-1)$  el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos.  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  representa la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observada en el apartado anterior, e  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ , el incremento de K (ver detalles en la sección “Análisis de la estructuración genética de las poblaciones mediante el software *Structure*.” pág. 92). El principal problema de la utilización del valor óptimo propuesto por esta metodología es que debe interpretarse (como los propios autores advierten) como un valor muy restrictivo para el número de *clusters* existentes en la población. Así pues se observa que este valor de K se suele corresponder con los grandes *clusters* existentes en la población, con aquellos grupos que presentan una mayor divergencia, quedando oscurecidos grupos internos dentro de estos *clusters* principales.

Por otro lado, otros autores (Zeisset & Beebee, 2001; Ciofi *et al.*, 2002; Hampton *et al.*, 2004) sin embargo, utilizan como criterio para evaluar el número de *cluster* el valor máximo para el  $L(K)=Pr(X|K)$ , obviando el problema bastante recurrente según el propio manual de *Structure*, de que los valores de  $L(K)$  continúen incrementándose pese a haber llegado a una meseta desde el punto de vista gráfico.

Debido a las posibles discrepancias en el valor de K en función de la metodología empleada, su valor se discutirá en cada caso concreto en función también de los datos biológicos que apoyen esos valores de K.

### *Infección por Wolbachia en C. parallelus.*

En primer lugar, se analizaron las cepas bacterianas detectadas sin atender a su posterior clasificación en supergrupos F y B (Fig. 57). Estos resultados mostraron una clara estructuración con valores de K que pueden variar entre K=3 y K=5. Puede observarse que en torno a estos valores se llega a una fase de meseta (Fig. 58). La metodología de Evanno *et al.* (2005) propondría un valor óptimo de K= 3, que podría corresponderse con los tres grupos claros, “Supergrupo B”, “Supergrupo F ibérico” y “Supergrupo F Europeo”. Para discernir entre los posibles subgrupos, se procedió de sus análisis por separado.

### *Supergrupo F.*

En el caso del supergrupo F (Fig. 59) se estimó K=2 poblaciones genéticas distintas, como valor más probable siguiendo la metodología de Evanno *et al.* (2005). Se corresponden con (i) aquellas detectadas en la región central de la Península Ibérica junto con las poblaciones españolas de la zona híbrida, y (ii) el resto de poblaciones europeas, incluyendo las poblaciones francesas de la zona híbrida, así como la población de Bubión (Granada). Por otro lado, el valor máximo de  $\Delta K$  se obtiene para un valor de K=4, disminuyendo los valores de K para un número superior de *clusters*. Para un K=3, se observa la subdivisión del primer grupo en dos, diferenciándose aquellas cepas distribuidas en el centro de la Península y el sur del Pirineo, de aquellas detectadas en la zona híbrida. Este valor de K podría estar respaldado desde una perspectiva biológica, dado el resto de datos. Incluso para K=4 se propone una subdivisión de las cepas que infectan mayoritariamente a las poblaciones de la zona híbrida (ver Tabla B17 del anexo B, así como Fig. A18 del anexo A).

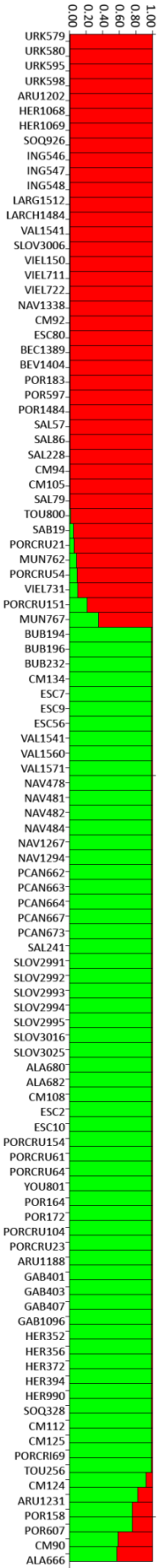
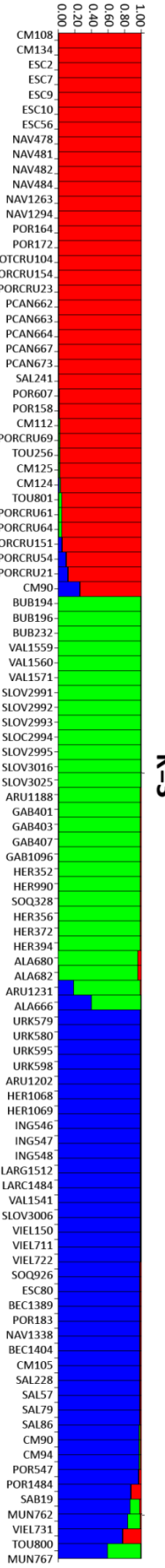
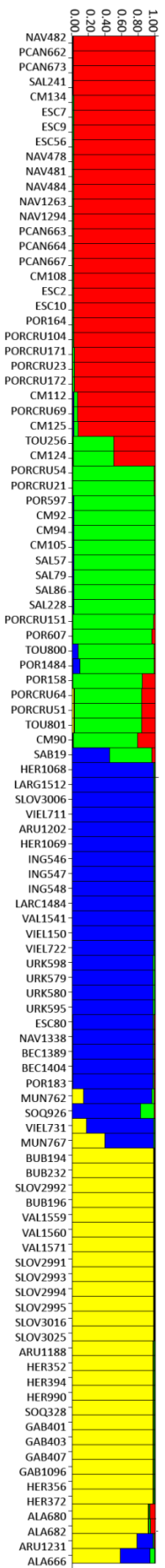
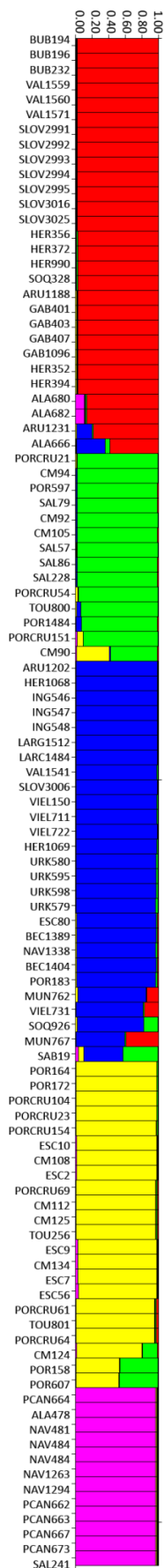


Fig. 57: Estima de la estructura poblacional sin considerar la subdivisión en supergrupos F y B, basándonos en el archivo alélico de cada espécimen. Cada individuo es representado por una barra vertical. El gráfico quedará dividido en K colores en función de las K poblaciones genéticas estimadas. En los individuos cuya barra muestra varios colores, su longitud nos indicará la probabilidad de pertenecer a una u otra subpoblación. Los análisis posteriores asumen un K=3 como valor óptimo.

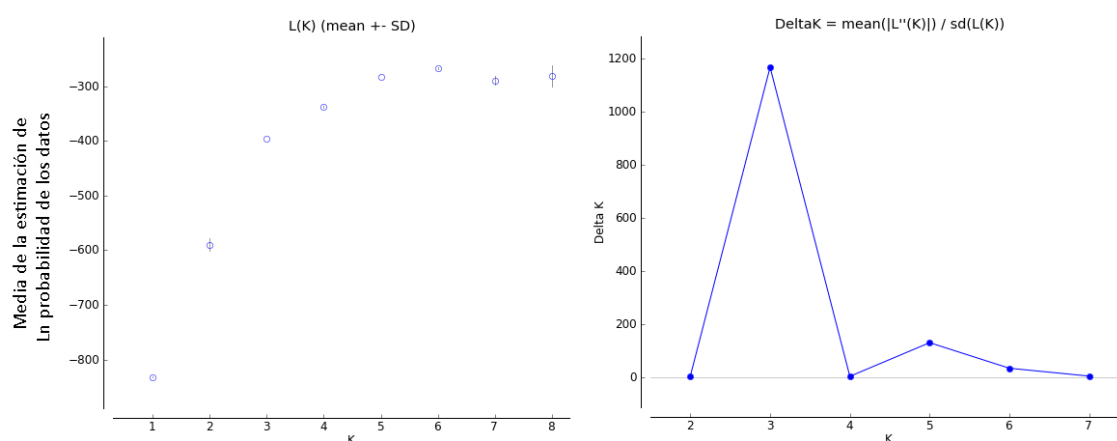


Fig. 58: a) Probabilidades posteriores para cada valor de K. b) Método de Evanno *et al.* (2005) para la estimación del K óptimo, siendo éste K=3.

K	Reps	Media LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-832.210000	0.506513	—	—	—
2	10	-589.510000	11.646502	242.700000	48.620000	4.174644
3	10	-395.430000	0.115950	194.080000	135.470000	1168.346604
4	10	-336.820000	1.432015	58.610000	4.480000	3.128459
5	10	-282.690000	0.292309	54.130000	38.010000	130.033710
6	10	-266.570000	1.146056	16.120000	38.630000	33.706903
7	10	-289.080000	7.513070	-22.510000	30.350000	4.039627
8	10	-281.240000	19.394283	7.840000	—	—

Tabla 7: Resultados de la metodología propuesta por Evanno *et al.* (2005). En amarillo el K óptimo detectado, K=2. Los cálculos se estimaron tras 10 repeticiones (Reps). Se calcularon y representaron los valores medios de  $L'(K)$ , su desviación típica ( $\text{Stdev LnP}(K)$ ),  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ .  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  supone el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos.  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  es la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observada en el apartado anterior, e  $\Delta K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$ , la variación de K (ver detalles en el apartado de material y métodos).

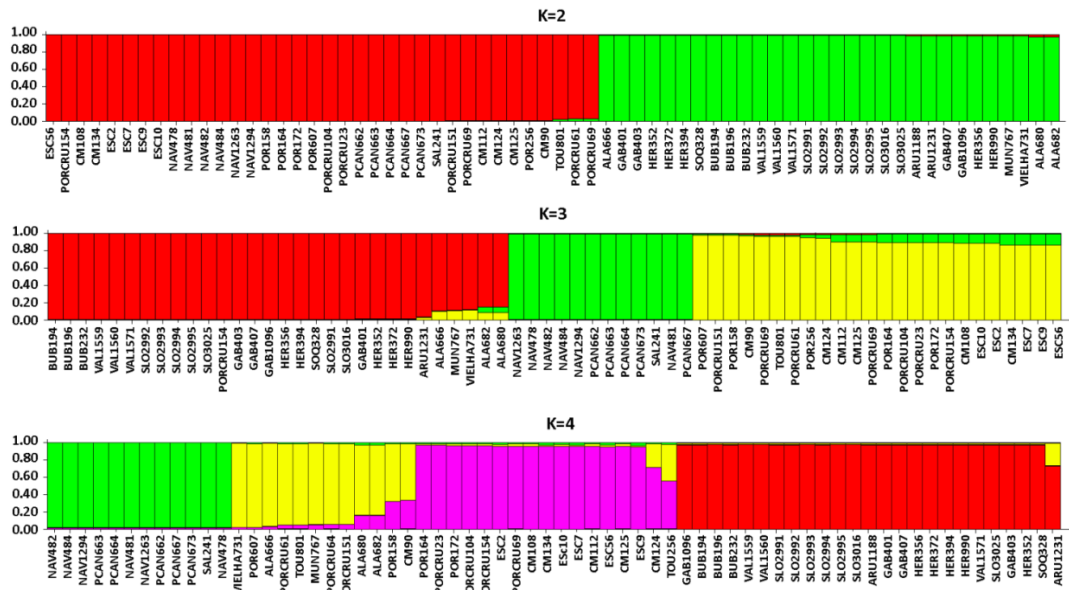


Fig. 59: Estima de la estructura poblacional en el supergrupo F, basándonos en el archivo alélico de cada individuo (representado por una barra vertical). El gráfico quedará dividido en K colores en función de las K poblaciones genéticas estimadas. En los individuos cuya barra muestra varios colores, su longitud nos indicará la probabilidad de pertenecer a una u otra subpoblación. Obsérvese que pese a incrementarse el número de poblaciones inferidas ( $K > 2$ ), siguen apreciándose dos grupos principales dentro del supergrupo F. En el caso de  $K = 3$ , podría inferirse una nueva subdivisión del supergrupo F, separándose aquellas cepas localizadas en poblaciones puras del hospedador, y aquellas cercanas a la zona híbrida. Incluso para  $K = 4$  se propone una subdivisión adicional para las cepas que infectan mayoritariamente a las poblaciones de la zona híbrida.

### *Supergrupo B.*

En el caso del supergrupo B, el patrón es más claro, dado que ambas metodologías defenderían un valor de  $K = 2$  (Fig. 60). Por tanto, podrían distinguirse un máximo de dos grupos, compuestos en primer caso por cepas detectadas en poblaciones puras y en los extremos de la zona híbrida, frente a cepas detectadas en las poblaciones centrales de la misma (ver Tabla B18 del anexo B, así como Fig. A19 del anexo A).

### *Análisis basado en las posiciones polimórficas de los 5 loci concatenados.*

A continuación se ha analizado la estructuración genética de las distintas cepas detectadas de *Wolbachia*. Cada cepa ha sido definida en base a las posiciones polimórficas de la secuencia resultante de considerar los genes concatenados. La pertenencia de los distintos individuos analizados a un determinado ST o complejo ST, teniendo en cuenta la metodología previa, puede consultarse en el anexo D.

Siguiendo la metodología previamente descrita, se ha concluido la existencia de un mínimo de 2 grandes grupos genéticos (Fig. 61). El primero de ellos, correspondiente al



supergrupo F de esta bacteria, el segundo perteneciente al supergrupo B. Los valores obtenidos para las probabilidades posteriores permitirían inferir un tercer, o incluso un cuarto o quinto grupo genético, si bien el incremento de la varianza para  $K > 3$ , hace que dichos grupos puedan interpretarse como un artefacto (ver figura A20 del anexo A y Tabla B19 del anexo B). Para corroborar este hecho, se ha procedido, tal y como sugieren los autores del software, a inferir la fragmentación genética dentro de estos dos grupos de forma independiente. Esta metodología es más potente a la hora de detectar subdivisión dentro de los grupos detectados por el primer análisis (Evanno *et al.*, 2005).

### Supergrupo F.

La inferencia de la fragmentación genética del supergrupo F indica la presencia de 2 grandes grupos genéticos (óptimo en  $K=2$ ), según Evanno *et al.* (2005), que separaría las cepas F “puras” de algunas de las cepas recombinantes que habían sido adscritos a este supergrupo en base al gen *16S rRNA*, pese a que parte de su genoma procediera del supergrupo B (Fog. 62).

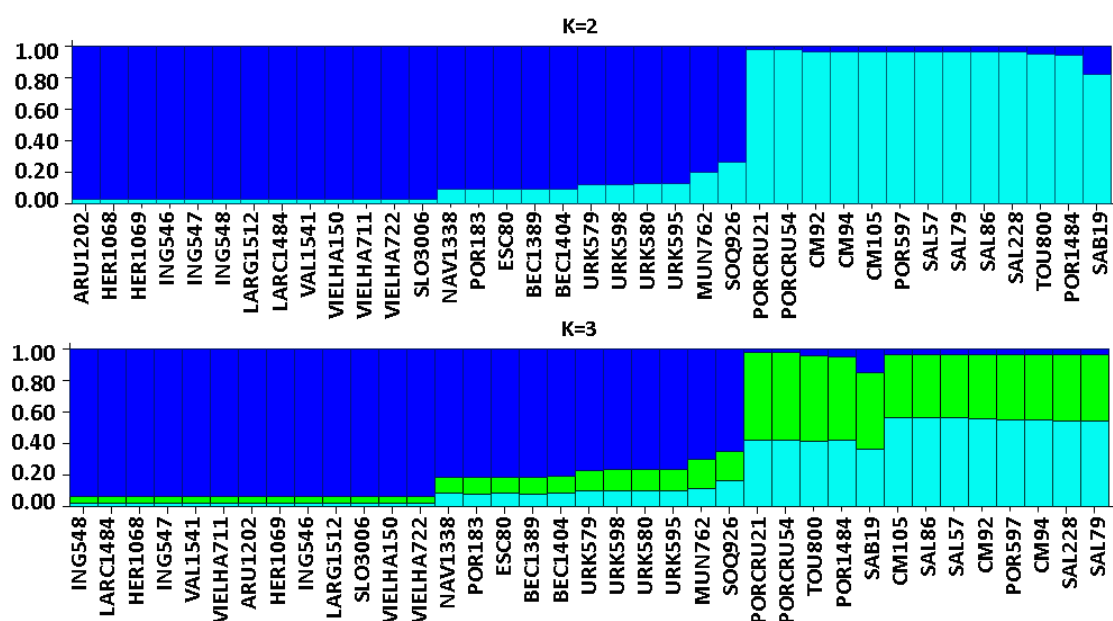


Fig. 60: Estima de la estructura poblacional en el supergrupo B, basándonos en el archivo alélico de cada espécimen. Cada individuo es representado por una barra vertical. El gráfico queda dividido en K colores en función de las K poblaciones genéticas estimadas. En los individuos cuya barra muestra varios colores, su longitud nos indica la probabilidad de pertenecer a una u otra subpoblación. Obsérvese que para  $K=2$ , se aprecian dos grupos, que a grandes rasgos separarían a aquellas poblaciones cuyo hospedador es puro, frente a aquellas cepas cuyo hospedador pertenece a las poblaciones centrales de la zona híbrida.

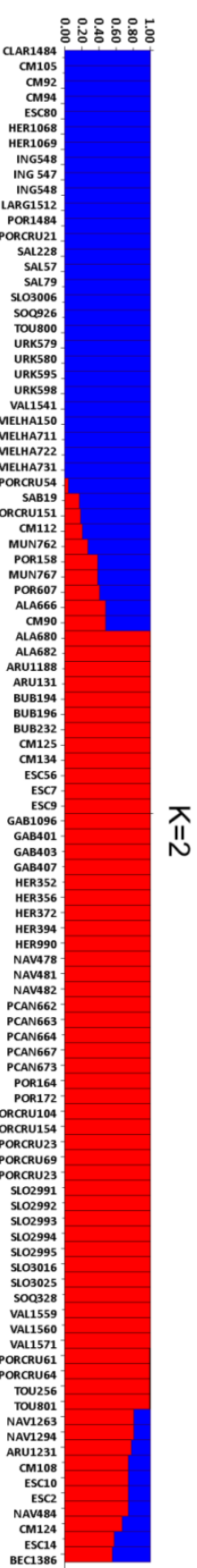
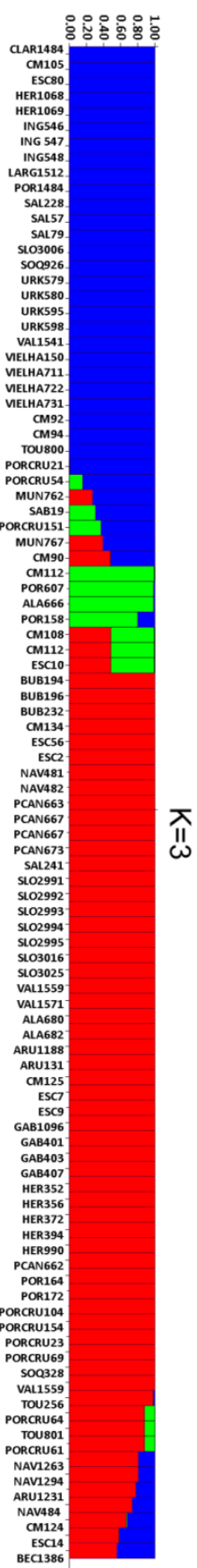
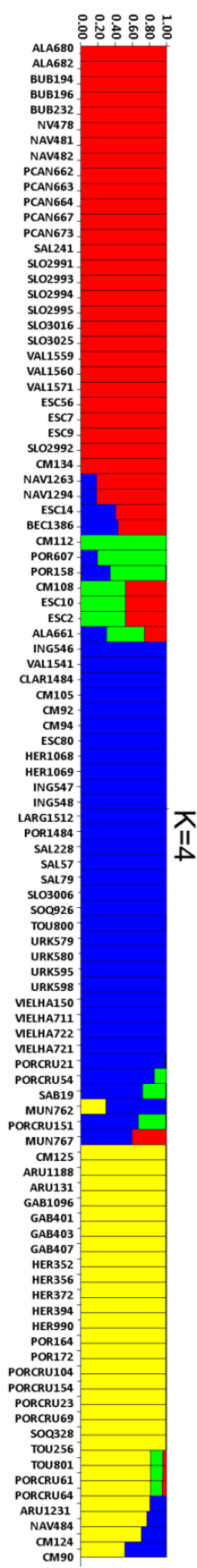
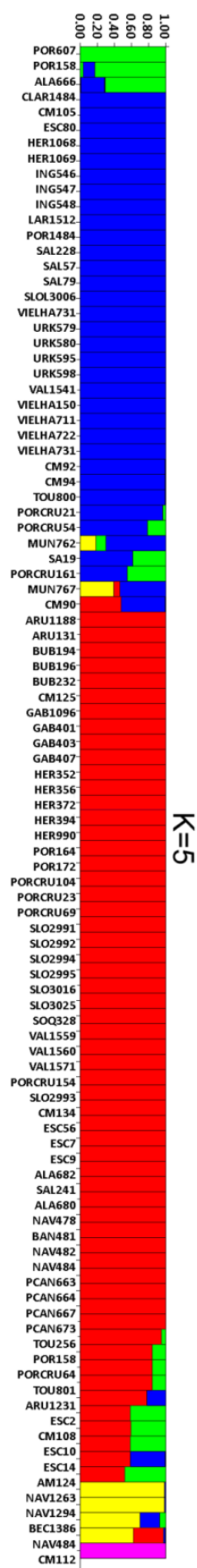


Fig. 61: Estima de la estructura poblacional. Cada individuo es representado por una barra vertical. El gráfico quedará dividido en K colores en función de las K poblaciones genéticas estimadas. En los individuos cuya barra muestra varios colores, su longitud nos indica la probabilidad de pertenecer a una u otra subpoblación. Obsérvese que pese a incrementarse el número de poblaciones inferidas ( $K > 2$ ), siguen apreciándose dos grupos principales, F (rojo) y B (azul). En su caso, podría inferirse una subdivisión del supergrupo F, separándose aquellas cepas localizadas en poblaciones puras del hospedador, y aquellas cercanas a la zona híbrida, con varias excepciones que hacen pensar que esta subdivisión pueda ser un artefacto. El análisis realizado a continuación pretende esclarecer esta situación.

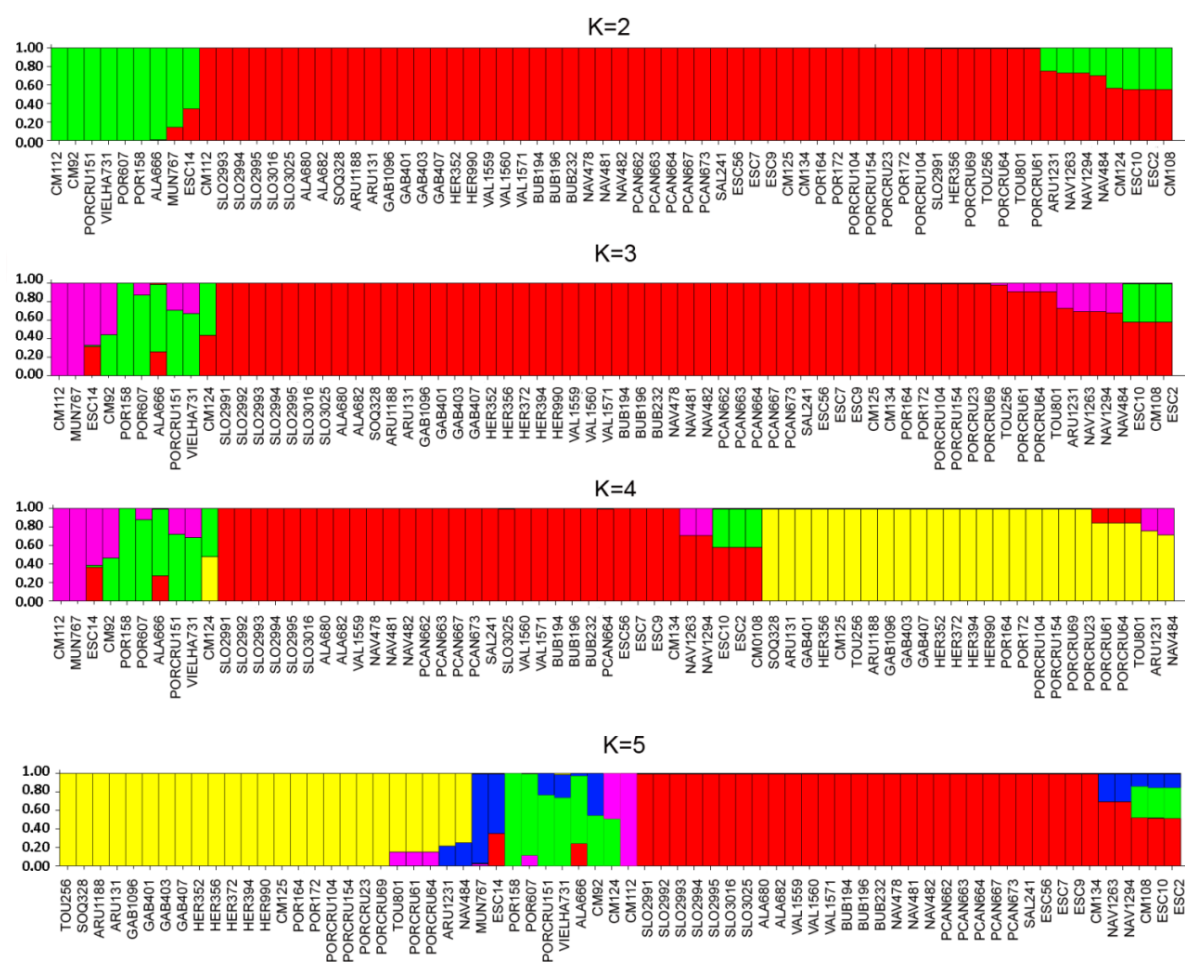


Fig. 62: Estima de la estructura poblacional del supergrupo F. Cada individuo es representado por una barra vertical. El gráfico quedará dividido en K colores en función de las K poblaciones genéticas estimadas. En los individuos cuya barra muestra varios colores, su longitud nos indicará la probabilidad de pertenecer a una u otra subpoblación. Pueden observarse dos grupos principales. En todo caso, podría inferirse una subdivisión posterior ( $K=5$ ), por la cual se agrupan (con excepciones) las cepas del supergrupo F que infectan a individuos puros de *C. parallelus* y las cepas del supergrupo F presentes en las poblaciones pirenaicas francesas y la zona híbrida. A su vez, pueden distinguirse que son las cepas consideradas como recombinantes tras el análisis mediante RPD4, las que tienden a agruparse en varios grupos independientes.

Valores superiores de K muestran un incremento en  $\ln(K)$  hasta valores máximos en torno a  $K=4$  o  $K=5$ , empezándose a observar un aumento de la varianza asociada a la fase de meseta. Si se incrementan el número de grupos, se observa la fragmentación de las cepas F en dos grandes grupos, además de aquellos que aparecen como consecuencia de la existencia de cepas recombinantes.

Estos dos grupos diferenciarían entre las cepas F tanto peninsulares, como europeas, y aquellas que aparecen en la zona francesa de la zona híbrida, incluyendo Arudy y Gabas, asociados a cepas recombinantes detectadas en poblaciones de la zona híbrida.

### *Supergrupo B.*

En el caso del supergrupo B pueden detectarse un máximo dos grupos genéticos,  $K=2$ , según Evanno *et al.* (2005) (Fig. 63). Esta estructuración parece asociarse a la presencia de recombinantes junto con los individuos B, parte de cuyo genoma procedería del supergrupo F. Los valores de  $L(K)$  parecen ratificar este valor, dado que para  $K=3$  no se observa un incremento sustancial en  $\ln(K)$  (ver Tabla B20 y B21 del anexo B).

## **28.7 Genealogía de las cepas bacterianas empleando el software**

### ***ClonalFrame.***

Para evitar los sesgos causados en el análisis filogenético debido a los eventos de recombinación entre cepas bacterianas, se ha complementado el estudio por ML e IB, mediante un análisis de genealogías mediante el software *ClonalFrame*, basado en la teoría de coalescencia (Kingman, 1982a; Didelot & Falush, 2007).

Este análisis permite analizar, tanto en el supergrupo B, como en el supergrupo F, las relaciones clonales entre las cepas de este género que infectan a *C. parallelus* (ver figura 62 y 63). La reconstrucción de estas genealogías se evaluó por repetición paralela de los cálculos en cinco ocasiones, reconstruyendo un árbol consenso. Las genealogías obtenidas mostraron 5 clados principales que se mantuvieron en todas las réplicas, si bien la topología del clado que incluye a los individuos recombinantes varió entre réplicas, asociándose éstos en ocasiones con el supergrupo B, y en ocasiones con el supergrupo F. Destaca también el caso de varios individuos muestreados en el País Vasco y la zona norte peninsular y pertenecientes al supergrupo F que, debido a que muestran cepas recombinantes para alguno de sus alelos, su posición también es variable entre las genealogías.

En el caso del supergrupo B, se observa una alta similitud entre secuencias, cuya variabilidad puede explicarse principalmente por mutaciones puntuales. En el caso del supergrupo F, vuelven a reconstruirse los grandes grupos descritos mediante MLST, y confirmados por las diferentes topologías inferidas por ML e IB. La base de la genealogía debe considerarse con precaución, debido a que la raíz del género *Wolbachia* no ha sido establecida de forma satisfactoria (Werren *et al.*, 2008b).

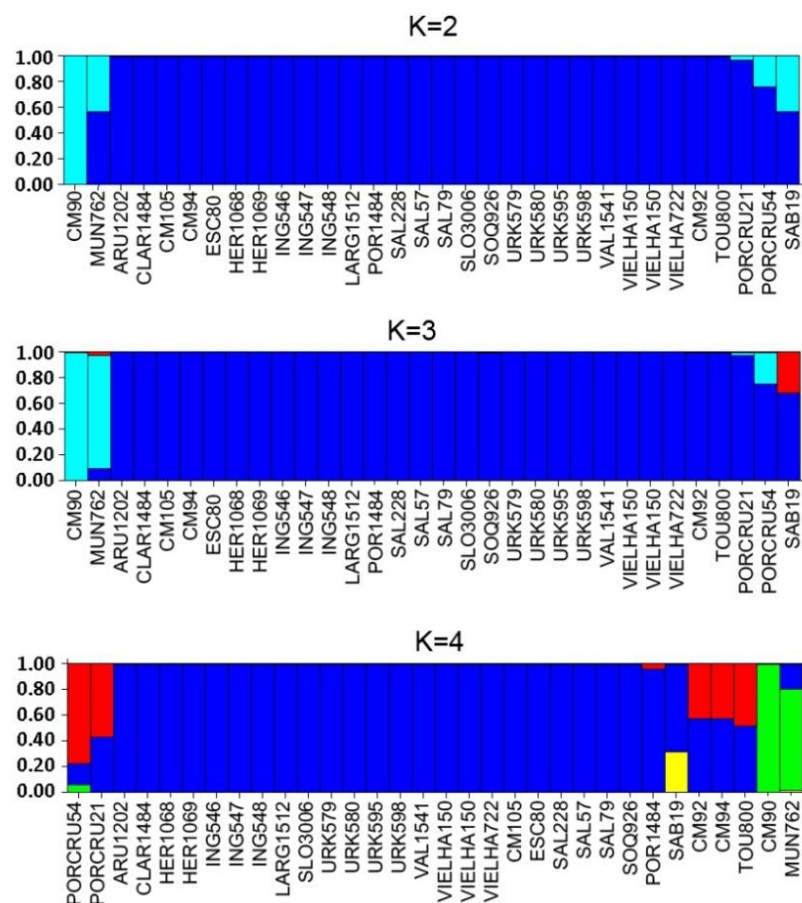


Fig. 63: Estima de la estructura poblacional dentro del supergrupo B. Cada individuo es representado por una barra vertical. El gráfico quedará dividido en K colores en función de las K poblaciones genéticas estimadas. En los individuos cuya barra muestra varios colores, su longitud nos indicará la probabilidad de pertenecer a una u otra subpoblación. Pueden observarse dos grupos principales. En primer lugar, detectamos aquellas cepas pertenecientes al supergrupo B; a su vez, puede distinguirse un segundo grupo, que incluiría las cepas consideradas como recombinantes tras el análisis mediante *RPD4*.

Se pueden observar varios clados, independientemente de su coincidencia o no con los análisis previos (Fig. 64 y Fig. 65).

- (i) Supergrupo B: Las cepas pertenecientes a este supergrupo se agrupan en un clado único, si bien cabe destacar la ubicación de las cepas detectadas en poblaciones híbridas en su

base, posiblemente debido a la aparición de alelos raros y sucesos puntuales de recombinación.

- (ii) Supergrupo F (I): Los Cp\_ST24 y Cp\_ST25 descritos en el centro peninsular.
- (iii) Supergrupo F (II): Donde se encuentra el complejo Cp\_ST12, presente en las poblaciones “no ibéricas”, pero también descrito en Bubión y relacionado con las cepas localizadas en el norte peninsular.
- (iv) Supergrupo F (III): Este clado se subdivide en dos grupos. El primero localizado en poblaciones centrales de la zona híbrida y el segundo grupo localizado en las poblaciones de su vertiente francesa. Los eventos de recombinación detectados apoyarían la hipótesis de que el Cp\_ST11 presente en estos individuos sea un ST recombinante, cuyo origen sea el complejo Cp\_ST12 tras sufrir varios procesos de recombinación tras su contacto con el supergrupo B, de ahí que el análisis mediante *ClonalFrame* lo asocie con algunas de las cepas recombinantes.

Recombinantes F: Por otro lado, cabe destacar la presencia de otro clado, cuyo origen es posiblemente el supergrupo F, y que incluye un gran número de STs recombinantes, gran parte de ellas detectadas en las poblaciones híbridas de Tourmont, Portalet y Corral de Mulas. Su origen se debería a distintos sucesos de recombinación y mutaciones puntuales que pueden observarse mediante la representación genética de eventos implementada en el software *ClonalFrame* (

Fig. 66). Este tipo de gráfico muestra todos los *loci* en el eje de las x, separados por líneas grises entre los bloques. Cada mutación puntual inferida queda indicada por una cruz, cuya intensidad representa la probabilidad con la que ésta queda fijada. Por otro lado, la línea roja indica para cada *locus* la probabilidad de que la variación que encontramos en una secuencia se deba a la recombinación entre cepas. Destacar así mismo la presencia de otras cepas como recombinantes, según el análisis mediante *RDP4* (Martin *et al.*, 2010), situadas junto al supergrupo B.

Para facilitar la comparación entre los resultados obtenidos mediante este análisis y la organización de las poblaciones propuesta previamente mediante el análisis mediante *Structure*, las figuras han sido construidas utilizando los colores propuestos previamente, tanto para el análisis basado en el archivo alélico de cada individuo, como aquel basado en las posiciones polimórficas. En general observamos que ambos análisis proponen una subdivisión de las cepas adscritas al supergrupo F en varios grupos. Esta subdivisión es clara en el análisis mediante

*ClonalFrame*, dado que secuencias determinadas en poblaciones distintas aparecen asociadas en clados separados. A su vez, el análisis *Structure* considerando el archivo alélico permite una clasificación que se ajusta en cierto grado a la distribución propuesta por *ClonalFrame*, quedando claros tres grupos (correspondientes a la vertiente francesa de la zona híbrida, las cepas identificadas en el Sistema Central y Puerto Cantó (Pirineos), así como varias cepas detectadas en la zona híbrida y poblaciones de sus extremos). Finalmente, vemos que el análisis basado en posiciones polimórficas, sólo nos recoge parcialmente esta subdivisión (con dos grandes grupos de secuencias y varias cepas consideradas como recombinantes que parecen tener una posición intermedia en la genealogía), frente a la mayor subdivisión mostrada por *ClonalFrame*.

## **28.8 Filogeografía de los supergrupos F y B.**

La estructuración geográfica de la infección fue valorada mediante un test de AMOVA, realizado a partir de las frecuencias de los ST en cada una de las poblaciones analizadas. Dicho test se realizó tanto para el supergrupo F, como para el supergrupo B, utilizando para la clasificación de los ST su adscripción inicial acorde con el gen *16S rRNA*. La agrupación de las poblaciones se realizó de acuerdo con los datos filogeográficos previos, y que sugerían la división de las poblaciones en varios grupos.

### **28.8.1 Filogeografía del supergrupos F.**

Se testaron distintas agrupaciones con el fin de encontrar la subdivisión que maximizara el valor de  $F_{CT}$ . Los resultados mostraron una clara estructuración poblacional, apoyando la hipótesis previamente sugerida por el resto de análisis, observándose 4 grandes grupos dentro del supergrupo F con un claro patrón geográfico.

La agrupación que mostró un mayor índice de  $F_{CT}$  fue la siguiente (Tabla 8):

El primero de los grupos, incluiría las poblaciones de Cpe localizadas en el centro de la Península Ibérica, y que se agruparon con las poblaciones pirenaicas como Puerto Cantó (denominada Pirineo Sur junto con Sabiñánigo), situadas en el extremo español del Pirineo, Escarrilla y Sallent.

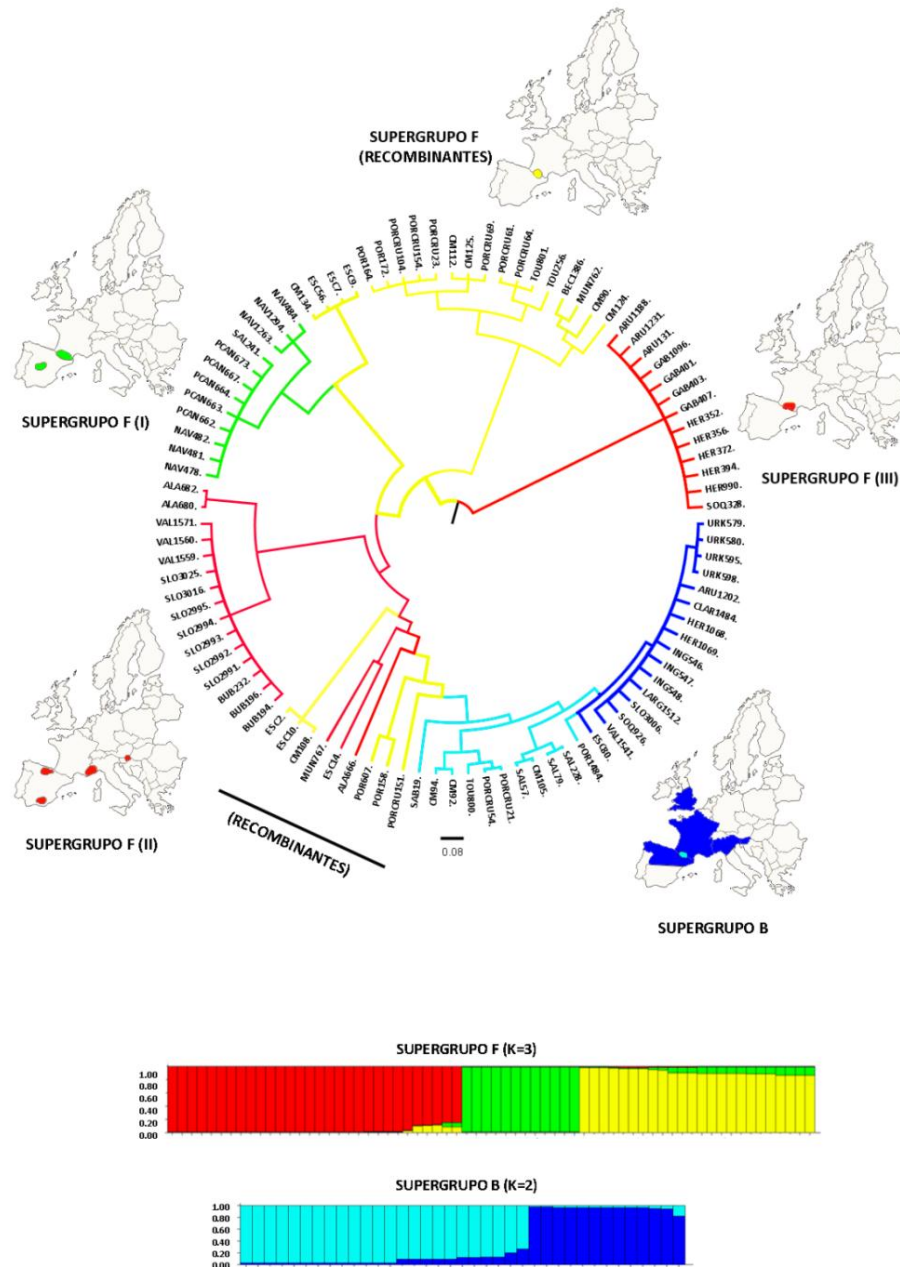


Fig. 64: Genealogía propuesta por el software *ClonalFrame*, comparado con los resultados propuestos por *Structure* a partir del archivo alélico de cada individuo según el MLST. Se han utilizado los colores de los clados inferidos por *Structure* (considerando K=2 en el caso del supergrupo B, y K= 3 en el caso del supergrupo F: ver miniatura debajo de la genealogía), sobre la topología del árbol obtenido mediante *ClonalFrame*. Las incongruencias entre ambos resultados serán evaluadas en la siguiente sección. Junto a los clados principales se sitúa un mapa geográfico indicando la localización aproximada de las muestras adscritas a dicho clado. Los clados han sido clasificados en función del supergrupo F o B al que pertenezcan las muestras. Como resultado pueden distinguirse 3 clados principales pertenecientes al supergrupo F, un clado perteneciente al supergrupo B, y varias cepas recombinantes.





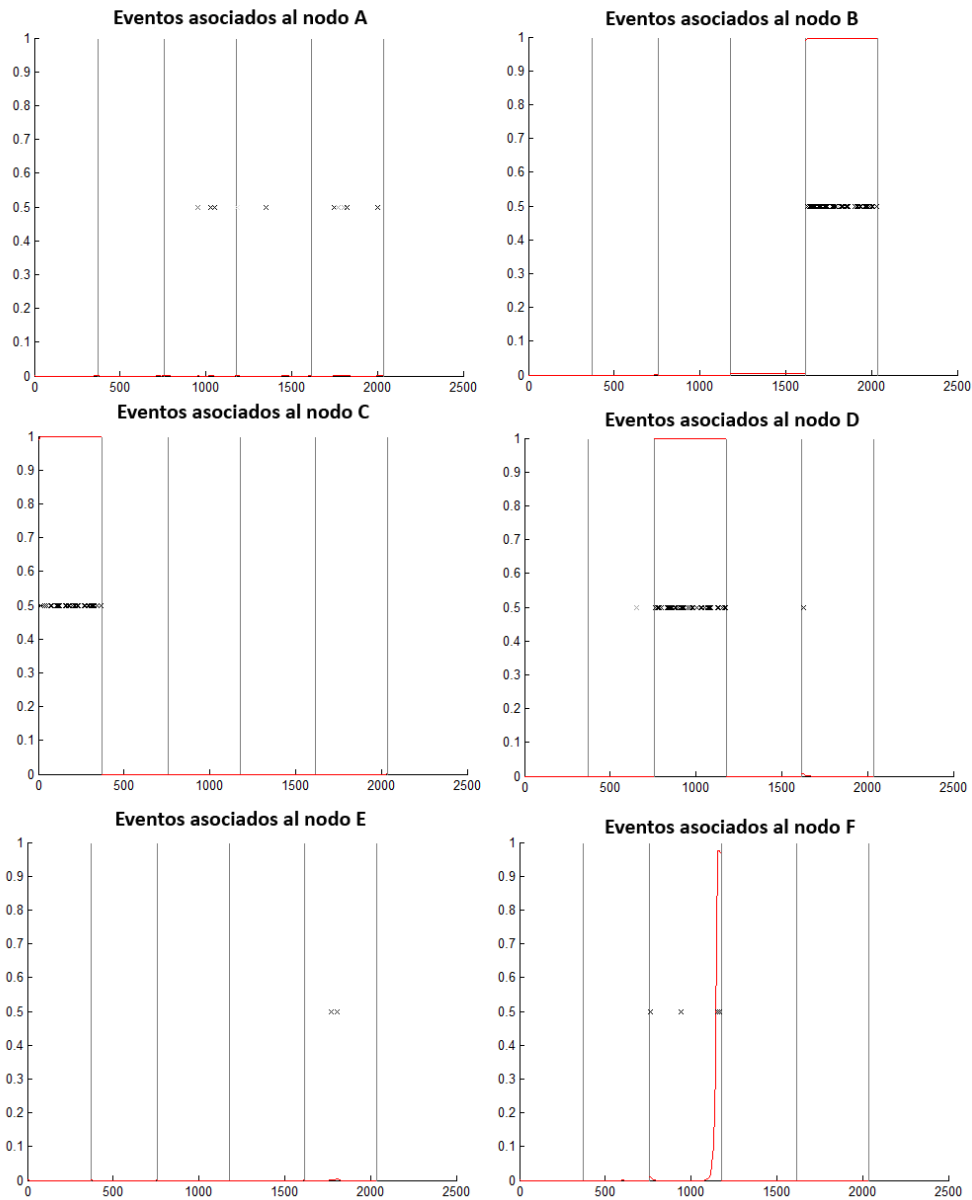
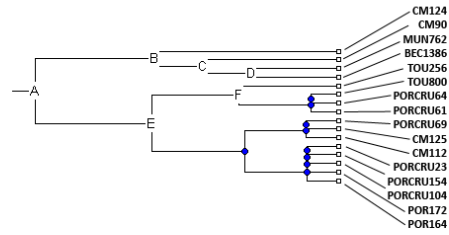


Fig. 66: Ejemplo de eventos inferidos en la genealogía construida mediante *ClonalFrame* en los distintos nodos: las “x” indican mutación, mientras que la línea roja indica la probabilidad de recombinación en una posición concreta.

En segundo lugar, se agruparon las poblaciones de Corral de Mulas, Portalet y C. Tourmont (zona híbrida), donde se habían detectado cepas recombinantes y alelos raros. En un tercer grupo se incluyeron las poblaciones francesas de la ZH. Finalmente, un cuarto grupo que incluía aquellas poblaciones situadas en el norte de la Península Ibérica, agrupadas con el resto de poblaciones europeas, así como la población ibérica, granadina, de Bubión.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3.00	820.69	13.60693 Va	39.80
Entre poblaciones. dentro de los grupos	9.00	305.51	4.52913 Vb	13.25
Dentro de las poblaciones	53.00	850.90	16.05475 Vc	46.96
Total	65.00	1977.11	34.19	
Indices de fijación		p-valor		
FSC : 0.22003		0.000		
FST : 0.53044		0.000		
FCT : 0.39797		0.000		

Tabla 8: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) realizado a partir de las secuencias moleculares concatenadas de los genes incluidos en el sistema MLST, en los individuos adscritos al supergrupo F, analizados en las distintas poblaciones de *C. parallelus*.

Para confirmar este resultado, se llevó a cabo un test de diferenciación entre poblaciones (*“Exact test of population differentiation”*) siguiendo la metodología de Rousset *et al.*(1992) implementado en *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005). Los datos corroboraron la diferenciación entre poblaciones asignadas a los distintos grupos (ver Tabla B22 en el anexo B). A su vez, el test de AMOVA *“locus by locus”*, permitió observar una alta estructuración poblacional, exceptuando el gen *hcpA*, cuyos niveles eran inferiores (ver Tabla B23 en el anexo B). Esto se refleja en un valor medio del  $F_{CT}=0,58424$ .

A continuación se valoró si esta estructuración genética estaba relacionada con la localización geográfica de las poblaciones. Para ello se procedió a realizar un Test de Mantel. Este análisis permitió comprobar que existe una correlación positiva ( $r_{Y1}: 0,338$ ), y estadísticamente significativa ( $p\text{-valor}=0,001$ ), entre la diferenciación genética de las cepas y su

separación geográfica, lo que apoya la estructuración filogeográfica de las cepas pertenecientes al supergrupo F. Esta correlación aumenta hasta valores de  $rY1: 0,483$ ;  $p=0,003$ ) si se elimina a la población de Bubión (Sierra Nevada) de los análisis.

### 28.8.2 Filogeografía del supergrupo B.

En relación al supergrupo B, el test AMOVA no detectó niveles altos de estructuración para las distintas agrupaciones poblacionales testadas. En el caso de la misma estructuración propuesta para el supergrupo B los valores de  $F_{CT}$  fueron muy interiores a los del supergrupo F (Tabla 9).

El test de Mantel tampoco mostró una correlación positiva entre la diferenciación genética de las poblaciones y su distancia geográfica ( $rY1:-0.214$ ;  $p\text{-valor}=0,831$ ). Lo que respalda la aparente homogeneidad del supergrupo, a excepción de aquellos individuos recombinantes con el supergrupo F.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2.00	45.56	1.35305 Va	17.35
Entre poblaciones, dentro de los grupos	8.00	65.32	1.07434 Vb	13.78
Dentro de las poblaciones	20.00	107.42	5.37119 Vc	68.87
Total	30.00	218.30	7.80	
Indices de fijación		p-valor		
FSC : 0.16668		0.110		
FST : 0.31126		0.174		
FCT : 0.17350		0.000		

Tabla 9: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) realizado a partir de las secuencias moleculares concatenadas de los genes incluidos en el sistema MLST, en los individuos adscritos al supergrupo B, analizados en las distintas poblaciones de *C. parallelus*.

## 29 DETECCIÓN DE OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE PCR-DGGE.

En los últimos años se han descrito nuevos endosimbiontes capaces de alterar la reproducción de sus hospedadores. De ahí la importancia de conocer en profundidad la diversidad de endosimbiontes que infectan a un organismo antes de adjudicar los posibles efectos que, por ejemplo *Wolbachia*, pueda tener en la inducción de IC. Para ello, y con el fin de identificar la comunidad bacteriana endosimbionte que potencialmente pueda afectar a la reproducción de *C. parallelus*, se realizó un ensayo PCR-DGGE, amplificando el gen bacteriano *16S rRNA* a partir del ADN extraído de las gónadas de varios individuos de *C. parallelus*.

El patrón de bandas detectado en el gen desnaturalizante (Fig. 67) mostró una comunidad bacteriana reducida. La mayoría de las muestras presentaron alguna/varias de las tres bandas principales, acompañadas en algunos individuos por bandas secundarias. La posterior secuenciación, demostró que este patrón claro de bandas se correspondía con dos géneros bacterianos: *Wolbachia* y *Spiroplasma* (banda 2), distinguiéndose fácilmente los dos supergrupos de esta bacteria, F (bandas 1a y 1b) y B (banda 3), e incluso los subtipos correspondientes al supergrupo F.

A su vez, debido a que en el estudio se analizaron individuos de distintas localizaciones geográficas, esto nos permitió hacer una primera aproximación a la presencia/ausencia de determinadas infecciones en varias poblaciones. En la Tabla 10 se recoge la información obtenida tras la secuenciación de las distintas bandas resultantes en cada individuo analizado.

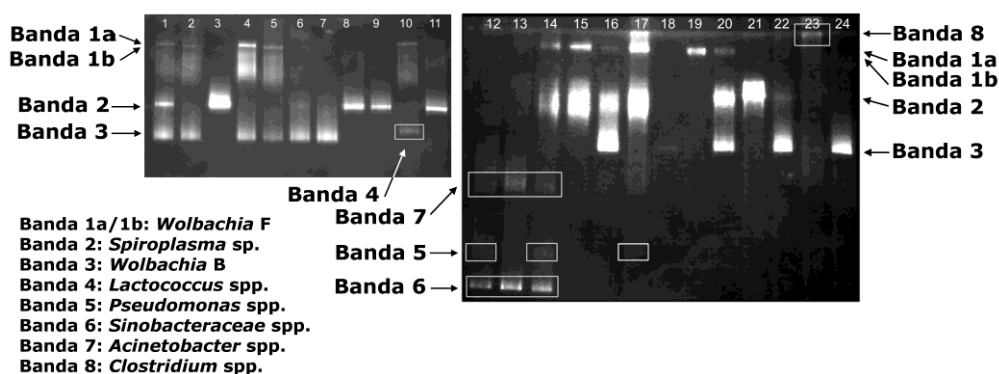


Fig. 67: Patrón de bandas caracterizado en los individuos analizados mediante el ensayo PCR-DGGE. Obsérvese la prevalencia de la infección por *Wolbachia* y por *Spiroplasma*.

## 29.1 Identificación del género *Wolbachia* en el ensayo PCR-DGGE.

El análisis PCR-DGGE confirmó la identificación de *Wolbachia* en todos aquellos individuos previamente caracterizados como “infectados” por esta bacteria. Este dato es relevante al tratarse de un control interno que nos permite conocer cuán sensible es la técnica PCR-DGGE a la hora de identificar la variabilidad bacteriana existente en las muestras.

El PCR-DGGE permite identificar las dos cepas principales pertenecientes al supergrupo F de *Wolbachia* previamente descritas en *C. parallelus*. Ambas pueden identificarse como las dos bandas (bandas 1a y 1b en Fig. 67), cuya posición en la electroforesis en gel desnaturalizante difiere ligeramente. La secuencia perteneciente a la banda 1a presenta homología con 2 secuencias descritas en individuos de *C. parallelus parallelus* (FJ438537.1 y FJ438538.1). Por otra parte, las secuencias obtenidas a partir de la purificación y secuenciación de las bandas 1b presentan homología con las secuencias FJ438535.1 and FJ438536.1, también identificadas en *C. parallelus erythropus* (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010).

Por otro lado, la PCR-DGGE permitió identificar el supergrupo B de *Wolbachia*. La secuencia obtenida a partir de la banda 3 del gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes presentó homología con la secuencia FJ438533.1, obtenida previamente en individuos de esta especie de ortópteros (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010).

A su vez, esta técnica nos permitió descartar la existencia de otros supergrupos no descritos de este género bacteriano, en la especie *C. parallelus* (Tabla 10).

## 29.2 Identificación de *Spiroplasma*.

La amplificación del gen bacteriano *16S rRNA* y su posterior análisis mediante un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, nos permitió identificar un nuevo endosimbionte asociado a la especie *C. parallelus*. La secuenciación del producto de PCR obtenido tras la purificación de la banda 2 del gel de acrilamida, permitió la identificación del género *Spiroplasma*. Este taxón bacteriano apareció en todas las poblaciones analizadas, con excepción de la granadina de Bubión.

El género *Spiroplasma* incluye un amplio grupo de bacterias asociadas a insectos, en los que suele inducir alteraciones reproductivas. Sin embargo, consideramos que es la primera vez que se detecta este endosimbionte en un acrido.



Por otro lado, comprobamos que la infección por *Spiroplasma* era independiente del sexo del hospedador ( $G=0,537$ , g.l.=1,  $p=0,358$ ). Este dato es relevante, dado que la infección por *Spiroplasma* suele producir alteraciones reproductivas, tales como muerte selectiva de los machos, de tal modo que se ve incrementado el número de hembras en la descendencia. La presencia de machos infectados sugiere que en el caso de *C. parallelus*, *Spiroplasma* no provoca tales alteraciones.

### 29.3 Identificación de otras bacterias.

El resto de las bacterias detectadas mediante esta técnica pertenecieron a los géneros bacterianos *Lactococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Sinobacteraceae* spp., *Acinetobacter* spp. y *Clostridium* spp. (Bandas 4-8, Fig. 67). Sin embargo, no disponemos de suficientes datos para evaluar la interacción entre estos géneros bacterianos con los endosimbiontes primarios y su hospedador *C. parallelus*.

Aparentemente, las bandas correspondientes a estas bacterias aparecen distribuidas al azar en las distintas poblaciones de *C. parallelus*, y su intensidad es, en general, menor respecto a las bandas principales. Esto podría interpretarse como una menor densidad bacteriana en las muestras (debido al carácter semicuantitativo del DGGE). Esta impresión queda respaldada por la hibridación en tejido, en la cual se observa una señal de hibridación baja en aquellos individuos que no están infectados ni por *Wolbachia*, ni por *Spiroplasma* (ver “Detección de *Wolbachia* y otros endosimbiontes mediante WCH”, pág. 207)

Por otro lado, cabe destacar que la mayor intensidad en las bandas asociadas a estas bacterias secundarias detectadas en los individuos “Tourmont 2” y “Sallent 1”, coincide con que estos individuos no estén infectados por *Wolbachia* o *Spiroplasma*. Estos datos deben tenerse en cuenta con precaución, si bien, podría indicar interacciones negativas entre los endosimbiontes principales, y aquellas bacterias secundarias.

A su vez, y debido a que durante la disección de las gónadas se pueden extraer otros tejidos adyacentes, incluido el aparato digestivo, la aparición de estos géneros microbianos debe ser interpretada con precaución. No pueden excluirse contaminaciones ambientales, tales como bacterias procedentes del suelo, de la cutícula..., o del propio manipulador.

Población	Genotipo	Individuo	sexo	<i>Spiroplasma</i>	F <i>Wolbachia</i>	B <i>Wolbachia</i>	Otros
Gabas	Cpp	1	♂	+		+	
	Cpp	2	♂	+		+	
	Cpp	3	♀		+		<i>Lactococcus</i> spp.
L'Hermine	Híbrido	1	♀				
	Híbrido	2	♂	+		+	
	Híbrido	3	♂				<i>Clostridium</i> spp.
C. Tourmont	Híbrido	1	♂	+	+		
	Híbrido	2	♀				<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonae</i> , <i>Sinobacteraceae</i>
Portalet	Híbrido	1	♀		+	+	
	Híbrido	2	♀	+	+		<i>Pseudomonae</i>
	Híbrido	3	♀	+	+	+	
Corral de Mulas	Híbrido	1	♀		+	+	
Sallent	Híbrido	1	♂				<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonae</i> , <i>Sinobacteraceae</i>
	Híbrido	2	♂	+	+	+	
	Híbrido	3	♀	+	+	+	
	Híbrido	4	♂		+	+	
Escarrilla	Cpe	1	♂	+	+		
	Cpe	2	♂		+		<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonae</i> , <i>Sinobacteraceae</i>
	Cpe	3	♀	+			
Navafría	Cpe	1	♀		+	+	
	Cpe	2	♂	+	+		
	Cpe	3	♀	+		+	
Bubi6n	Cpe	1	♀		+		
	Cpe	2	♀		+		
Puerto del Cant6	Cpe	1	♀	+			
	Cpe	2	♂	+	+		
Col de L'Arche	Cpp	1	♂	+		+	
Valdieri	Cpp	1	♂			+	
	Cpp	2	♂			+	
Epping Forest	Cpp	1	♂			+	

Tabla 10: Infecci6n por *Spiroplasma* y/o distintos supergrupos de *Wolbachia* en los individuos analizados. La detecci6n fue llevada a cabo a partir de la amplificaci6n del gen *16S rRNA* mediante *primers* universales, seguido de un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, aislamiento de la bandas, reamplificaci6n y posterior secuenciaci6n. \* Bandas muy tenues; \*\* La banda 2 del carril 2, se interpreta como un artefacto.



## 29.4 Reconstrucción filogenética.

Se construyó una filogenia con las secuencias obtenidas en este estudio, tanto pertenecientes al género *Wolbachia*, como al género *Spiroplasma*.

En el primero de los casos, se elaboró un árbol filogenético mediante IB, y enraizado en *Rickettsia* sp. Para su construcción se incluyeron secuencias pertenecientes a los supergrupos de *Wolbachia* A, B, C, D, E, F, H, J y K. Las probabilidades posteriores se muestran en cada uno de los nodos. Como esperábamos basándonos en estudios previos (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010), las secuencias previamente descritas para esta bacteria infectando a *C. parallelus* se agrupan en los supergrupos F y B. Nuestros resultados apoyan la monofilia del clado “supergrupo F” (ver apartado “Filogenia y filogeografía de *Wolbachia*”, pág 248), dentro del cual estarían tanto las distintas secuencias descritas en *C. parallelus*, como aquellas referidas en *Odontotermes* spp. Del mismo modo, los resultados apoyan la monofilia del supergrupo B.

En el caso del género *Spiroplasma*, se construyó un árbol filogenético mediante IB. Para ello, se incorporaron secuencias correspondientes al género *Spiroplasma* (incluidas las obtenidas en este estudio), así como secuencias pertenecientes a los géneros *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma*, *Asteroleplasma*, *Erysipelothrix*, *Clostridium*, *Acholeplasma*, *Phytoplasma* y *Anaeroplasmata*. La bacteria *Escherichia coli* fue empleada para enraizar el árbol (ver Fig. 68 y Fig.A23 de los anexos).

La cepa que infecta a *C. parallelus* pertenece al clado *Citri-Chrysopicola-Mirum* (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b), que se caracteriza por incluir cepas bacterianas que producen alteraciones reproductivas en sus hospedadores. Dicho clado contiene a los serogrupos I, II, V y VIII (Gasparich *et al.*, 2004). En particular, los datos muestran que la cepa bacteriana que infecta a *C. parallelus* pertenece al clado Citri-Poulsonii. Puede consultarse la nomenclatura de los distintos clados en Gasparich *et al.* (2004).

## 29.5 Multi-infección por los géneros *Wolbachia* y *Spiroplasma*.

Existen varios estudios que proponen distintos modelos de interacción, desde la cooperación hasta la competencia, en los casos en los que más de una especie bacteriana infecte a un mismo hospedador (Aksoy & Rio, 2005; Geiger *et al.*, 2009; Lindh & Lehane, 2011).

Tras describir la infección por *Spiroplasma* en *C. parallelus*, quisimos comprobar si la infección por *Wolbachia* favorecía o impedía la infección por este segundo endosimbionte. Para ello, se analizó la independencia entre ambas infecciones utilizando un modelo *log-linear*. El

análisis confirmó la independencia entre ambas infecciones ( $G^2 = 0,84$ ;  $p = 0,36$ ), así como la infección entre *Spiroplasma* y los distintos supergrupos de *Wolbachia* ( $G^2 = 2,35$ ;  $p = 0,67$ ). Debido al escaso número muestral ( $n = 30$ ), estos datos deben considerarse con precaución y serán ampliados por el siguiente experimento.

## 29.6 Filogeografía de la infección por *Spiroplasma*.

Parte de este trabajo fue realizado en el contexto del proyecto “Infección por *Spiroplasma* de poblaciones naturales de *Chorthippus parallelus*”, realizado en parte por Charikleia Soultouki, bajo la codirección del Dr. José L. Bella Sombria, y de Paloma Martínez Rodríguez. Se detectó la infección por *Spiroplasma* en individuos previamente caracterizados para *Wolbachia* en el seno de esta tesis doctoral. El protocolo utilizado, puesto a punto en el experimento de PCR-DGGE, permitió estimar los porcentajes de infección aproximados de este endosimbionte en poblaciones naturales de *C. parallelus*.

### *Filogenia de Spiroplasma.*

La inclusión de un mayor número de individuos en esta parte del estudio permitió detectar algunas variantes del gen *16S rRNA* de esta bacteria. Las variantes reveladas presentaban una similitud muy alta, mayor del 98%, por lo que no consideramos que sean cepas distintas, sino variaciones de una misma cepa bacteriana que infecta de forma uniforme distintas poblaciones de este ortóptero. El estudio filogenético de las distintas variantes de esta bacteria detectadas en *C. parallelus* permitió confirmar su caracterización dentro del clado Citri-Chrysopicola-Mirum, y en particular, su inclusión en el clado Citri-Poulsonii (Gasparich *et al.*, 2004), tal como ha sido descrito en Martínez-Rodríguez *et al.* (2013b).

### *Distribución geográfica de la infección.*

Uno de nuestros principales intereses era conocer si la infección por *Spiroplasma* está relacionada con los patrones de infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*, así como los efectos que una posible asociación pudiera tener en los patrones de infección detectados y su implicación en la zona híbrida.

Para ello se analizó la distribución de la infección en las distintas poblaciones muestreadas de este ortóptero, así como la independencia entre ambos endosimbiontes. Se seleccionaron un mínimo de 10 individuos de cada población a analizar, de modo que 5 de ellos estuvieran infectados por *Wolbachia*, y 5 hubieran sido categorizados como “no infectados” por



esta bacteria. Esto no fue posible en las poblaciones de Eslovenia y Bubión (donde la práctica totalidad de los individuos estaban infectados por *Wolbachia* F), y en las poblaciones de Noruega (donde todos los individuos estaban infectados por *Wolbachia* B). Previamente, se había analizado la infección por *Spiroplasma* y otras bacterias en 30 individuos como parte del estudio de ecología microbiana descrito anteriormente (sección “Detección de otros endosimbiontes mediante PCR-DGGE”, pág. 195). Estos datos también fueron incluidos en el análisis.

Se eligieron 5 individuos infectados por *Wolbachia* y 5 no infectados de cada población. Se evitó seleccionar 10 individuos al azar en cada población para evitar que la marcada distribución geográfica de la infección por *Wolbachia* (con poblaciones muy infectadas y otras apenas infectadas) influyera en el análisis de independencia entre endosimbiontes. De esta manera, nuestro análisis estudia interacciones del tipo: ¿existe una mayor probabilidad de estar infectado por *Spiroplasma*, si este individuo está infectado también por *Wolbachia*?, excluyendo siempre el componente biogeográfico. Eligiendo individuos al azar, nuestros datos presentarían un exceso o defecto de infectados por *Wolbachia* en función de la población analizada. A su vez, una distribución geográfica similar entre los dos endosimbiontes, no descartable debido a la historia evolutiva de su hospedador, se podría interpretar erróneamente como una interacción positiva entre ambas infecciones. Esto es, podríamos interpretar erróneamente que existe una mayor probabilidad de estar infectado por *Spiroplasma* si también se está infectado previamente por *Wolbachia*, debido únicamente a que en determinadas poblaciones existe alta infección por ambos.

Las frecuencias relativas de infección por *Spiroplasma* en distintas poblaciones de este ortóptero se muestran en la Fig. 69 y la Tabla 11.

No se observó un patrón claro en la infección por este endosimbionte. *Spiroplasma* infecta con frecuencias variables gran número de poblaciones tanto ibéricas, como del continente europeo, con independencia de la subespecie de *C. parallelus*. Sin embargo, cabría hacer notar que determinadas poblaciones periféricas, incluyendo Rogaland (Noruega), Inglaterra, así como las poblaciones ibéricas de Bubión (Granada) y Ortigueira (A Coruña), no están infectadas. Frente a esto, se observan frecuencias altas de infección en la región de Alpes Marítimos, así como en Eslovenia, y las poblaciones francesas de la zona híbrida. El tamaño muestral es limitado, por lo que los resultados deben considerarse con precaución.



Fig. 68: Reconstrucción filogenética realizada mediante inferencia bayesiana del gen *16S rRNA* del género *Spiroplasma*. Se señalan en verde las secuencias detectadas en las cepas que infectan a *C. parallelus* tras el análisis de la infección en poblaciones ibéricas y europeas. Se incluyen secuencias de los géneros *Mycoplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Anaeroplasma*, *Phytoplasma*, *Asteroleplasma*, *Clostridium*, *Bacillus*, y finalmente, la especie *Escherichia coli* a modo de “outgroup”.

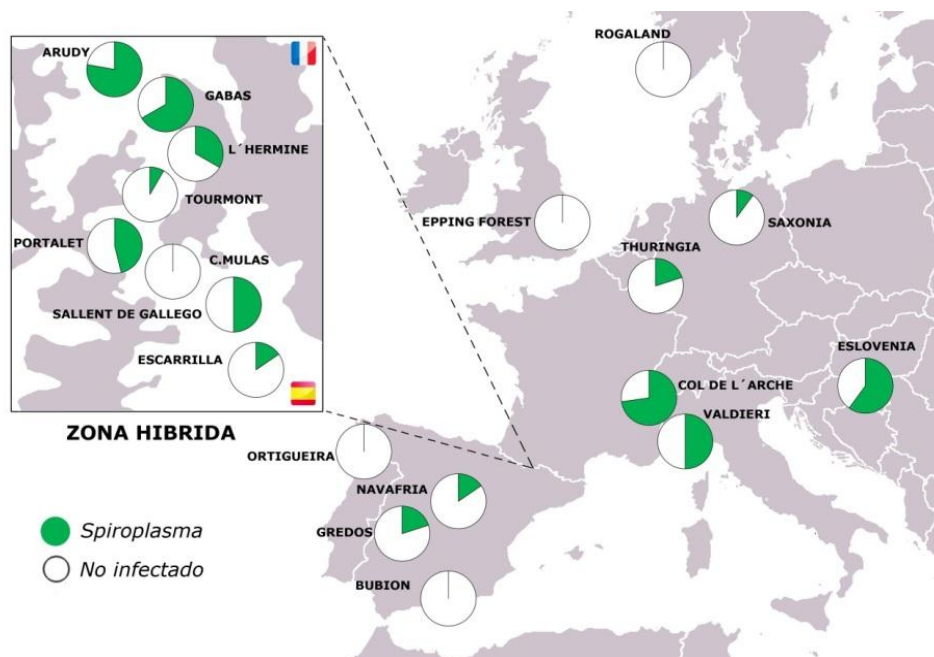


Fig. 69: Infección por *Spiroplasma* en distintas poblaciones de *C. parallelus*. Obsérvese en los gráficos circulares correspondientes a cada población las frecuencias relativas de infección por este endosimbionte (sección verde).

Población	S	F	B	SF	SB	FB	SFB	No infectados	TOTAL
Arudy	4	2					3	1	10
Bubi6n		2							2
C.Mulas		2	1			3		5	11
Sallent	2		2		1	1	4	4	14
C. Tourmont		2	3	1				6	12
Col de L'Arche	4		2		4			1	11
Escarrilla	1	3	3	1				5	13
Gabas		1			2				3
Inglaterra		10	1						11
L'Hermine					1			2	3
Navafria		4		1	1	2		5	13
Ortigueira			5					5	10
Plat. Gredos		2		2		1		5	10
Portalet	1		2	3	1	1	1	4	13
Puerto Cant6		1		1					2
Rogaland			11						11
Saxonia			4		1			5	10
Eslovenia		4		6					10
Thuringia	1		4		1			4	10
Valdieri	2		3		4			3	12
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>33</b>	<b>41</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>55</b>	<b>191</b>

Tabla 11: Infecci6n por *Spiroplasma* y/o *Wolbachia* en las poblaciones de *C. parallelus* analizadas con el fin de determinar la independencia de ambos endosimbiontes. "S" significa infecci6n por *Spiroplasma*, "F" infecci6n por el supergrupo F de *Wolbachia*, y "B" infecci6n por el supergrupo B de este 6ltimo endosimbionte. Los distintos tipos de coinfectados son identificados con la combinaci6n de estas letras.

Se realizó un test AMOVA (Tabla 12), para el cual se agruparon las poblaciones en dos grupos, centrales y periféricas, tomando como “centrales” las poblaciones de Eslovenia, Thuringia, Saxonia, y Alpes, y como “periféricas” el resto de las poblaciones muestreadas- Dicho criterio atendió a la plausible expansión poblacional del hospedador tras la última glaciación. No se observó una diferenciación entre las poblaciones.

Por otro lado, se analizó esta distribución en la infección mediante un test de Mantel. En este caso, la correlación entre distancia geográfica y diferenciación no fue significativa ( $r_{Y1}=0,145$ ,  $p=0,084$ ).

### *Análisis de independencia*

El análisis de modelos log-lineales nos permite conocer cuán bien se ajustan nuestros datos a un modelo lineal en el que se incluyen progresivamente las interacciones entre variables. A su vez, gracias a las propiedades aditivas del estadístico G, podemos seleccionar aquel modelo que mejor explique los datos experimentales, utilizando la diferencia entre los valores del estadístico  $G^2$  de dos posibles modelos, y valorando si estas diferencias son significativas. Se aceptará el modelo más simple siempre que la diferencia entre los valores de G sea menor que el valor correspondiente a una distribución  $\chi^2$  (g.l.,  $p\text{-valor}<0,05$ ), siendo los g.l. igual a la diferencia entre los grados de libertad asignados en cada modelo (García Pérez, 2005).

En primer lugar se analizó mediante esta metodología, la independencia entre endosimbiontes sin considerar los distintos supergrupos de *Wolbachia*. Por tanto se testó si existía independencia entre *Wolbachia* y *Spiroplasma*. Nuestro análisis respalda la independencia entre endosimbiontes a un nivel de significación de  $p=0.01$  ( $G^2=2,621$ , g.l.=1,  $p\text{-valor}=0,105$ ). Los análisis realizados en el proceso de decisión entre modelos, basado en la diferencia entre sus valores de G permiten confirmar este hecho. Para ello se comparan aquellos modelos cuyo p-valor indicaba que podían explicar los datos experimentales (se acepta la hipótesis nula, es decir el modelo testado, con un  $p\text{-valor}>0.01$ ). Por ejemplo, en la Tabla 13 y a modo de ejemplo, puede observarse la comparación entre los distintos casos en los que existe interacción entre dos variables (casos en rojo) y el caso en el que existe independencia (caso en azul), con el fin de distinguir el que mejor se ajusta a los datos. La diferencia entre el modelo que propone independencia total, y aquellos que proponían interacción entre *Spiroplasma* y *Wolbachia*, es menor que el valor de  $\chi^2$ (g.l.=1,  $p\text{-valor}=0,05$ )=3.84, por lo que se acepta la hipótesis nula (independencia). Esto apoya la independencia entre las variables “infección por *Spiroplasma*” e “infección por *Wolbachia* (F o B)”. En todo caso, estos datos sin embargo arrojan

la posibilidad de una interacción entre los supergrupos F y B de *Wolbachia* (valor resaltado en rojo).

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	1.563	0.00944 Va	4.19
Entre poblaciones, dentro de los grupos	18	12.942	0.05994 Vb	26.61
Dentro de las poblaciones	171	26.647	0.15583 Vc	69.19
Total	190	41.152	0.22521	
Indices de fijación				
FSC :	0.27779	p-valor		
		0.00000		
FST :	0.30806	0.00000		
FCT :	0.04192	0.16813		

Tabla 12: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) realizado a partir de las secuencias moleculares concatenadas del gen *16S rRNA* de *Spiroplasma* detectado en los individuos infectados de las distintas poblaciones de *C. parallelus*.

Modelo	g.l.	G <sup>2</sup>	p-valor	G <sup>2</sup> (rojo)-G <sup>2</sup> (azul)
3 indep.				
S, B, F	4	12,640	0,013	
2 indep.				
S, B, F, SB	3	11,420	0,010	1,220
S, B, F, SF	3	9,909	0,019	2,731
S, B, F, FB	3	5,265	0,153	7,375
1 indep.				
S, B, F, SB, SF	2	8,686	0,013	
S, B, F, SB, FB	2	4,042	0,133	
S, B, F, FB, SF	2	2,535	0,282	
0 indep.				
S, B, F, SB, SF, FB	1	0,357	0,550	
S, B, F, SB, SF, FB, SFB	0	4,41E-15		

Tabla 13: Valores de G<sup>2</sup> y p-valores para los distintos modelos ensayados. A su vez se muestran los análisis realizados en el proceso de decisión entre modelos, basados en la diferencia entre sus valores de G. Se descarta dependencia entre la infección por *Wolbachia* y *Spiroplasma*. Posible interacción entre los supergrupos F y B (valor en rojo).

Nuestro análisis, sugiere con un nivel de significación ( $p=0,01$ ) la independencia entre la infección por *Spiroplasma* y la infección por *Wolbachia* (modelo S, B, F:  $p\text{-valor}=0,013$ ), así como la posible interacción entre el supergrupo F y el supergrupo B de *Wolbachia* (modelo S, B, F, FB:  $p\text{-valor}=0,153$ ). Puede comprobarse que los modelos más complejos no suponen una mejora, por lo que se apoyaría este nivel de interacción entre variables: cuando se compara el modelo de independencia con aquel que propone dependencia entre *Wolbachia* B y *Spiroplasma*, el modelo de “independencia” explica mejor los datos experimentales. Esto mismo ocurre en el caso de la comparación entre el modelo de independencia y aquel que propone dependencia entre *Spiroplasma* y el supergrupo F, la diferencia entre los valores de G no es suficiente para respaldar la interacción entre endosimbiontes.

La interacción entre los supergrupos F y B debe tomarse con precaución, pues posiblemente se trate de un artefacto como consecuencia de la selección de los individuos.

Otra forma más intuitiva de estudiar el ajuste de los distintos modelos, sería observar la reducción en la desviación de los datos experimentales respecto a los propuestos por el modelo log lineal testado, según se incorporan al modelo la interacción entre distintas variables (ver Tabla 14).

Hipótesis nula	g.l.	Desviación residual	g.l.	Desviación residual	Pr(>Chi)	
NULL	7	81.815				
No Spiro	1	37.299	6	44.516	1,01E-06	***
No F Wol	1	21.174	5	23.342	4,19E-03	***
No B Wol	1	10.702	4	12.640	0.001070	**
No Spiro: No F Wol	1	2731	3	9909	0.098446	.
No Spiro: No B Wol	1	1.223	2	8.686	0.268803	
No F Wol: No B Wol	1	8.329	1	0.357	0.003901	**
No Spiro: No F Wol: No B Wol	1	0.357	0	0.000	0.550254	

Tabla 14: Resumen de los resultados para el modelo log-lineal. Reducción en la desviación de los datos experimentales respecto a los propuestos por el modelo log lineal testado, según se incorporan al modelo la interacción entre distintas variables. Significación: ‘\*\*\*’ $\approx 0,000$ ; ‘\*\*’ $=0,001$ ; ‘\*’ $=0,01$ ; ‘.’ $=0,05$ . Null=‘ ’ ; Spiro= *Spiroplasma*; Wol= *Wolbachia*.

Este análisis respalda la independencia entre *Spiroplasma* y el supergrupo B de *Wolbachia*, dado que la inclusión de la interacción entre estos endosimbiontes no reduce de forma significativa la desviación de los datos experimentales respecto a los estimados mediante el modelo ( $p<0,01$ ). De nuevo puede observarse la posible interacción entre ambos supergrupos



de *Wolbachia* con un nivel de significación del 0.05. Si bien, como hemos mencionado, dicho resultado podría ser un artefacto inducido por la selección de individuos para el estudio (ver el apartado de Discusión).

## **30 DETECCIÓN DE *WOLBACHIA* Y OTROS ENDOSIMBIOTES MEDIANTE WCH.**

### **30.1 Detección de *Wolbachia* mediante WCH en tejidos incluidos en parafina.**

La estructura general de las gónadas de *C. parallelus* (Fig. 70) puede observarse en las secciones de tejido teñidas mediante hematoxilina-eosina (Fig. 71 y Fig. 72). No se observaron diferencias anatómicas entre individuos infectados y no infectados.

El sistema reproductivo femenino consiste en dos ovarios rodeados de glándulas accesorias. Los ovarios están formados por las ovariolas, que contienen una fila de huevos conectados por una membrana de tejido conectivo. La cobertura del huevo se irá formando de forma progresiva durante su desplazamiento por la ovariola: Se formará una fina membrana vitelina alrededor del vitelo, mientras una membrana interna, denominada corion, será secretada paulatinamente por las células foliculares. Progresivamente se irán añadiendo nuevas capas de corion. El sistema reproductivo masculino consiste en un par de testículos y conductos seminales rodeados de tejido conectivo. Cada testículo consiste en una serie de folículos tubulares, conectados en su extremo. Cada folículo está formado por células meióticas rodeadas por células parietales, ver Fig. 70 (Uvarov, 1966).

La detección de *Wolbachia* mediante WCH en secciones de tejido previamente desparafinado y cortado según técnicas habituales (Martínez *et al.*, 2009) fue llevada a cabo tanto en gónadas de individuos infectados, como en individuos no infectados a modo de control negativo.

Previamente se detectó la presencia/ausencia de *Wolbachia* mediante PCR a partir del ADN extraído de parte de la gónada. Por otro lado, y con el fin de comprobar la eficiencia de la extracción de ADN del propio tejido incluido en parafina, se detectó la infección a partir del ADN extraído siguiendo la metodología de Chan *et al.* (2001b). En ambos casos, se pudo caracterizar la infección de los individuos a nivel de supergrupo, por lo que la técnica de obtención de ADN propuesta por estos autores puede considerarse como alternativa, en el caso de que se disponga únicamente de tejido incluido.

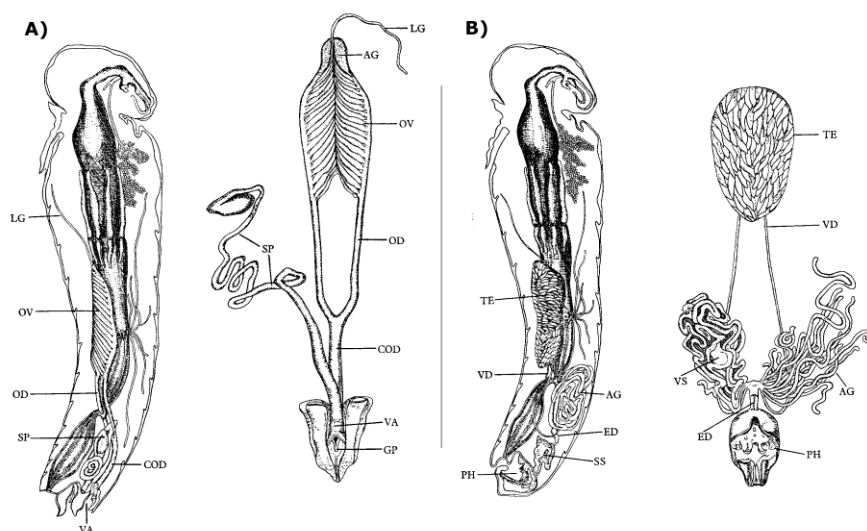


Fig. 70: Esquema tomado de Uvarov (1966) en el que puede observarse la estructura de la genitalia A) femenina y B) masculina de un saltamontes. LG-ligamento, AG-glándula accesoria, OV-Ovario, OD-Oviducto, COD-Oviducto común, SP-Espermateca, VA-Vagina, GP-Gonoporo, TE-Testículo, VD-Conducto seminal, ED-Conducto eyaculatorio, SS-Saco eyaculatorio, VS-Vesícula seminal, PH-Complejo fálico, AG-Glándula accesoria.

La hibridación se llevó a cabo utilizando tanto las sondas diseñadas para detectar el 16S *rRNA* bacteriano, como aquellas diseñadas para su unión al mRNA del gen *wsp*, sin que se observaran diferencias en la intensidad o tipo de señal. A modo de control, y con el fin de valorar la efectividad de ambas sondas, se hibridaron al mismo tiempo secciones adyacentes del mismo individuo con una y otra sonda, así como con sus correspondientes controles negativos. La hibridación fue en todos los casos equivalente.

Pudo detectarse señal de hibridación (Fig. 73) en toda la gónada femenina, así como en sus tejidos adyacentes, a modo de puntos de hibridación aislados. En general, se pudieron apreciar diferencias en la densidad bacteriana en las células foliculares (Fig. 73A), en relación a las glándulas accesorias (Fig. 73C). Estas diferencias eran consistentes en varios individuos, pero no fueron cuantificadas.

*Wolbachia* fue detectada únicamente en el citoplasma a modo de células bacterianas aisladas, tal y como había sido descrito previamente (Gomez-Valero *et al.*, 2004). De igual modo, las bacterias aparecen diseminadas en el tejido conectivo. El que la infección no se restrinja estrictamente a la gónada apoyaría datos preliminares sobre la infección de otros órganos, realizados mediante la detección de la bacteria mediante la amplificación por PCR a partir del ADN extraído a partir del fémur de estos organismos, concretamente en individuos de la población pirenaica de Vielha (2008). Pese a que esta técnica no resultó adecuada para determinar si un individuo estaba o no infectado debido al alto porcentaje de falsos negativos (esto es no existía una buena correspondencia entre la infección por *Wolbachia* en fémur y en gónada), se demostró la

existencia de infección en el tejido muscular del fémur (resultados no recogidos en este trabajo). Previamente se habían realizado experimentos similares, con resultados parecidos (Zabal-Aguirre *et al.*, com. pers.).

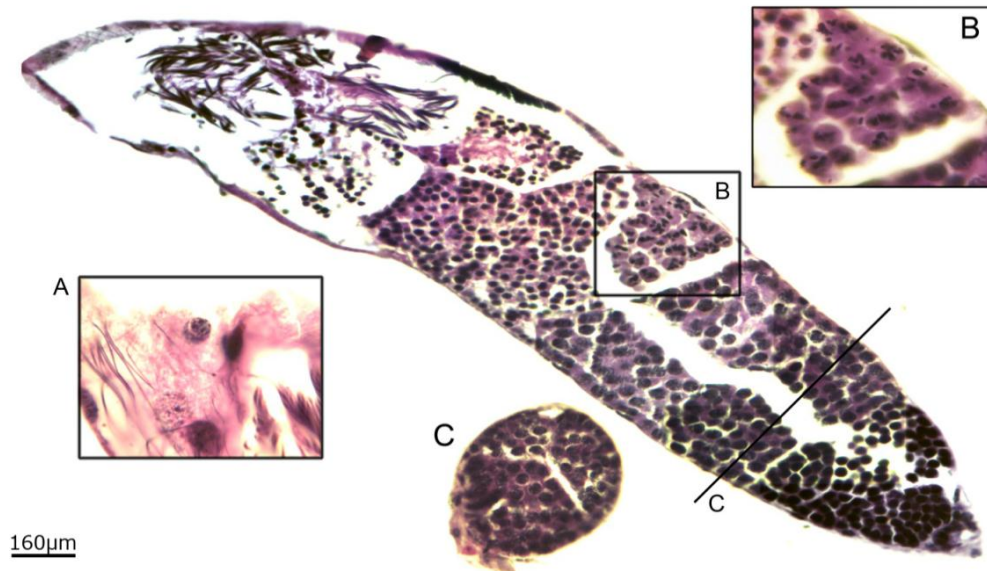


Fig. 71: Observación al microscopio de campo claro de un corte longitudinal de un folículo testicular de *Chorthippus parallelus*, teñido con hematoxilina-eosina (HE). Nótese la organización células en cistos. A) Formación de espermátidas, B) Cisto de células en metafase II, C) corte transversal del folículo.

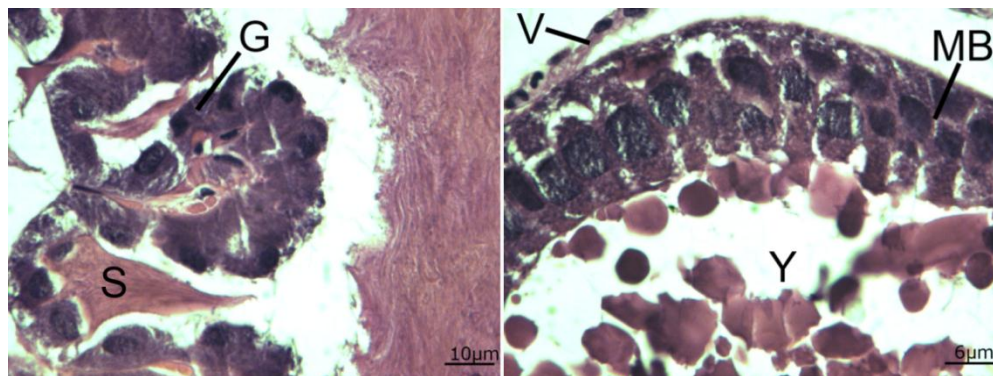


Fig. 72: Observación al microscopio de campo claro de un corte histológico del aparato reproductor femenino de *Chorthippus parallelus* teñido mediante hematoxilina-eosina (HE). a) Glándulas accesorias (G) y secretoras (S); b) Membrana vitelina (V), primera membrana del huevo (MB) rodeando el vitelo (Y).

En el caso de los machos, la hibridación sobre tejido permitió detectar la infección por *Wolbachia* tanto en la gónada como en los tejidos adyacentes. La infección fue homogénea en el testículo, y todos los folículos presentaron señal de hibridación (Fig. 73). Por otra parte, las células parietales que rodean al folículo también mostraron hibridación (Fig. 73). Durante la espermatogénesis *Wolbachia* presenta una distribución polarizada, las bacterias tienden a agregarse en uno de los polos de la célula pre-espermática (Fig. 74). No se detectó la presencia de la bacteria en espermátidas maduras.

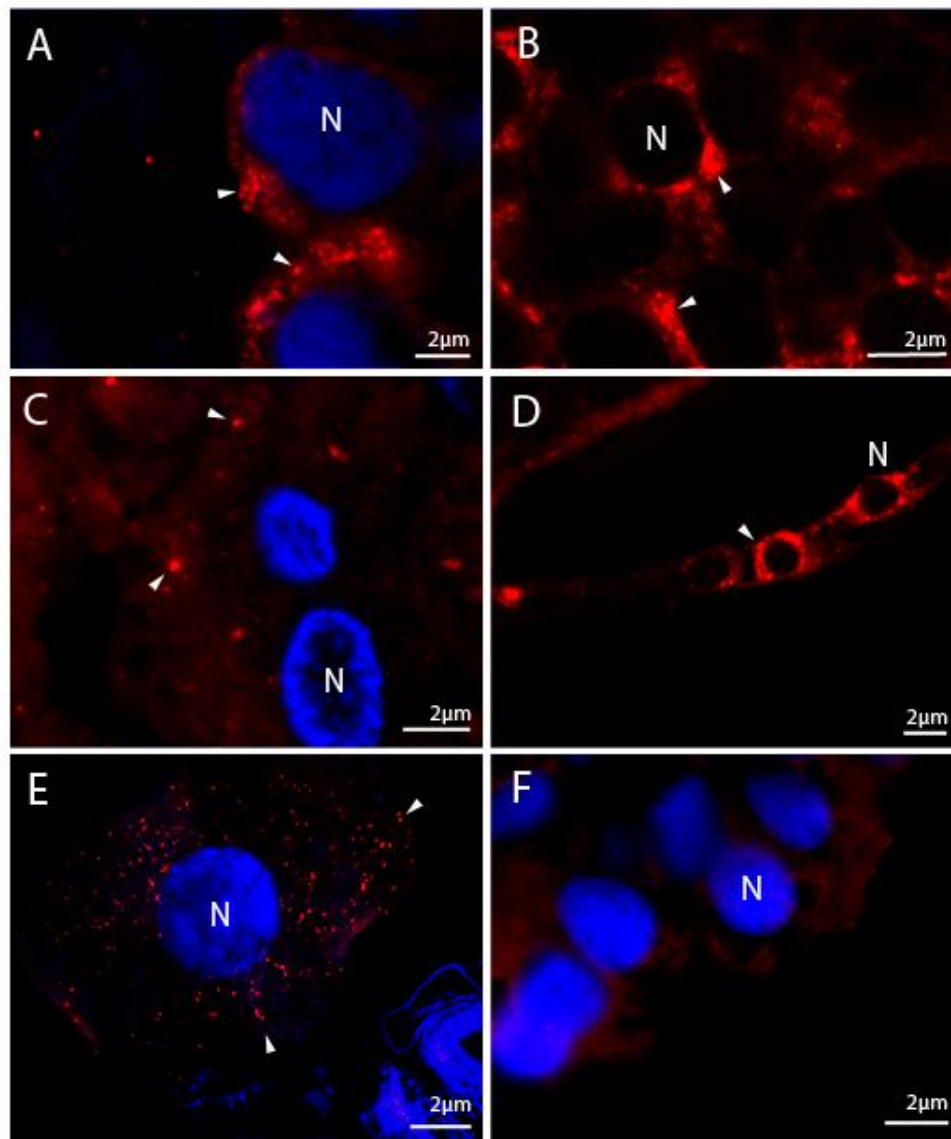


Fig. 73: Observación al microscopio de fluorescencia, tras la técnica de WCH sobre: A) Células foliculares femeninas infectadas por *Wolbachia* (flechas blancas), B) Meiocitos masculinos infectados por *Wolbachia*, C) Glándulas accesorias femeninas infectadas por *Wolbachia*, D) Células parietales masculinas, rodeando a los folículos, E) Aplastado de testículo, F) Glándulas accesorias fecales no infectadas por *Wolbachia*. En todos los casos la contratinción (azul) se realizó con DAPI, de acuerdo con lo indicado en la sección de Material y Métodos.

Se observaron diferencias en la densidad bacteriana entre individuos, tanto entre hembras, como entre los machos, si bien el estudio debe ampliarse para poder valorar estas diferencias. Aunque la cuantificación por diagnóstico de imágenes puede plantearse, la PCR cuantitativa podría ser una técnica más apropiada para evaluar estas variaciones. Este punto será valorado en la discusión de los resultados.

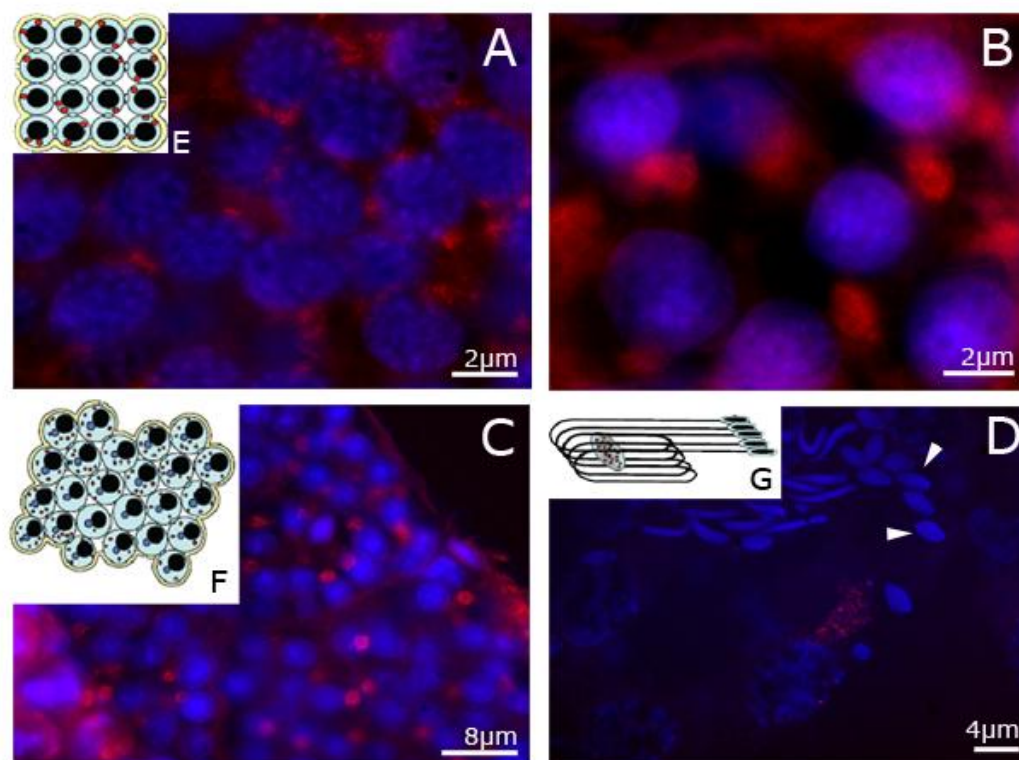


Fig. 74: Observación al microscopio de fluorescencia, tras la técnica de WCH sobre: A) Espermatogonias, B) Meiocitos primarios, C) Meiocitos secundarios, D) Espermatidas inmaduras (flechas blancas). Las imágenes E, F y G, procedentes de Serbus *et al.* (2008), representan esquemáticamente la distribución de las células bacterianas, en rojo, en el citoplasma de la células del hospedador durante la espermatogénesis. Contratinción con DAPI (azul), de acuerdo con lo indicado en la sección de Material y Métodos.

### 30.2 Detección de otros endosimbiontes mediante WCH.

En el contexto del experimento anterior, y tras detectarse en el experimento de DGGE-PCR la infección por *Spiroplasma* de individuos de *C. parallelus* (expuesto previamente en la sección “Infección por *Spiroplasma*.”, pág. 305), se realizó una primera aproximación a la detección de otros endosimbiontes mediante WCH en la gónada de individuos de *C. parallelus*. Previamente a la hibridación se caracterizaron y seleccionaron individuos pertenecientes a una de las siguientes categorías: (i) infectado por *Wolbachia* y *Spiroplasma*, (ii) infectado por

*Spiroplasma*, pero no por *Wolbachia* (iii) No infectado ni por *Spiroplasma*, ni por *Wolbachia*. Para ello, se amplificó el ADN genómico de estos individuos utilizando cebadores específicos para ambos géneros bacterianos, tal y como se describe en el apartado de “Material y métodos”.

Se empleó la hibridación simultánea de las sondas específicas de *Wolbachia* con la sonda EU338, universal de bacterias, marcada con fluoresceína. Los puntos de hibridación doble nos indican la presencia de *Wolbachia*, mientras que los puntos de hibridación exclusivos de la sonda EU338 representan otros endosimbiontes. La sonda específica de *Wolbachia* sólo hibrida en parte de los puntos de hibridación de la sonda EU338.

Los resultados muestran que si bien puede existir hibridación inespecífica, ésta es muy reducida y esta inespecificidad puede limitarse aun más incrementando la concentración de formamida de la mezcla de hibridación o la temperatura de los lavados. De este modo, podemos confirmar que las hibridaciones previas, efectuadas cuando desconocíamos la presencia de *Spiroplasma* y utilizando únicamente la sonda específica de *Wolbachia*, eran suficientemente específicas. Cabe destacar la importancia de este tipo de controles, en los que se observa una doble hibridación, a la hora de describir la distribución bacteriana de este endosimbionte y evitar considerar hibridación inespecífica (Pernthaler *et al.*, 2001).

Se procedió a la hibridación de cortes de tejido procedentes de individuos infectados por ambos géneros bacterianos (Fig. 75). La contratinción con DAPI permitió la visualización de los núcleos (Fig. 75-1a). En este caso, la sonda universal (EU338-Fluoresceína) (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995) hibridó sobre cualquier bacteria (Fig. 75-1b) presente en el tejido (incluyendo *Wolbachia* y *Spiroplasma* además de cualquier otra bacteria). A su vez, las sondas específicas de *Wolbachia* marcadas con biotina y reveladas con TexasRed-avidina (sondas para el *16S rRNA* y *wsp*) hibridaron de forma específica sobre las células de *Wolbachia* (Fig. 75-1c). El montaje de las tres imágenes, permite detectar a *Wolbachia* en amarillo, como consecuencia de la doble hibridación. A su vez, aquellas células bacterianas que permanezcan en verde, se corresponderán tanto al género *Spiroplasma*, por el que se encontraba infectado el individuo, como a otras posibles bacterias presentes en la muestra. La hibridación es homogénea en el citoplasma celular, excluyendo los núcleos.

En segundo lugar, se hibridó utilizando tres sondas (EU338-Fluoresceína junto con las sondas específicas para el *16S rRNA* y *wsp* de *Wolbachia*) cortes procedentes de individuos no infectados por *Wolbachia*, pero que estaban infectados por *Spiroplasma*. El objetivo de este ensayo era inferir la localización de las células de *Spiroplasma* en el tejido de *C. parallelus*. (Fig. 75, 2a-2d). La sonda universal para Eubacterias EU338 permitió la hibridación de *Spiroplasma*, sin descartar otras posibles bacterias. La ausencia de hibridación de las sondas específicas de



*Wolbachia*, demostró su especificidad. La localización de las células de *Spiroplasma* se restringió al citoplasma celular, así como a las zonas de contacto entre célula y célula.

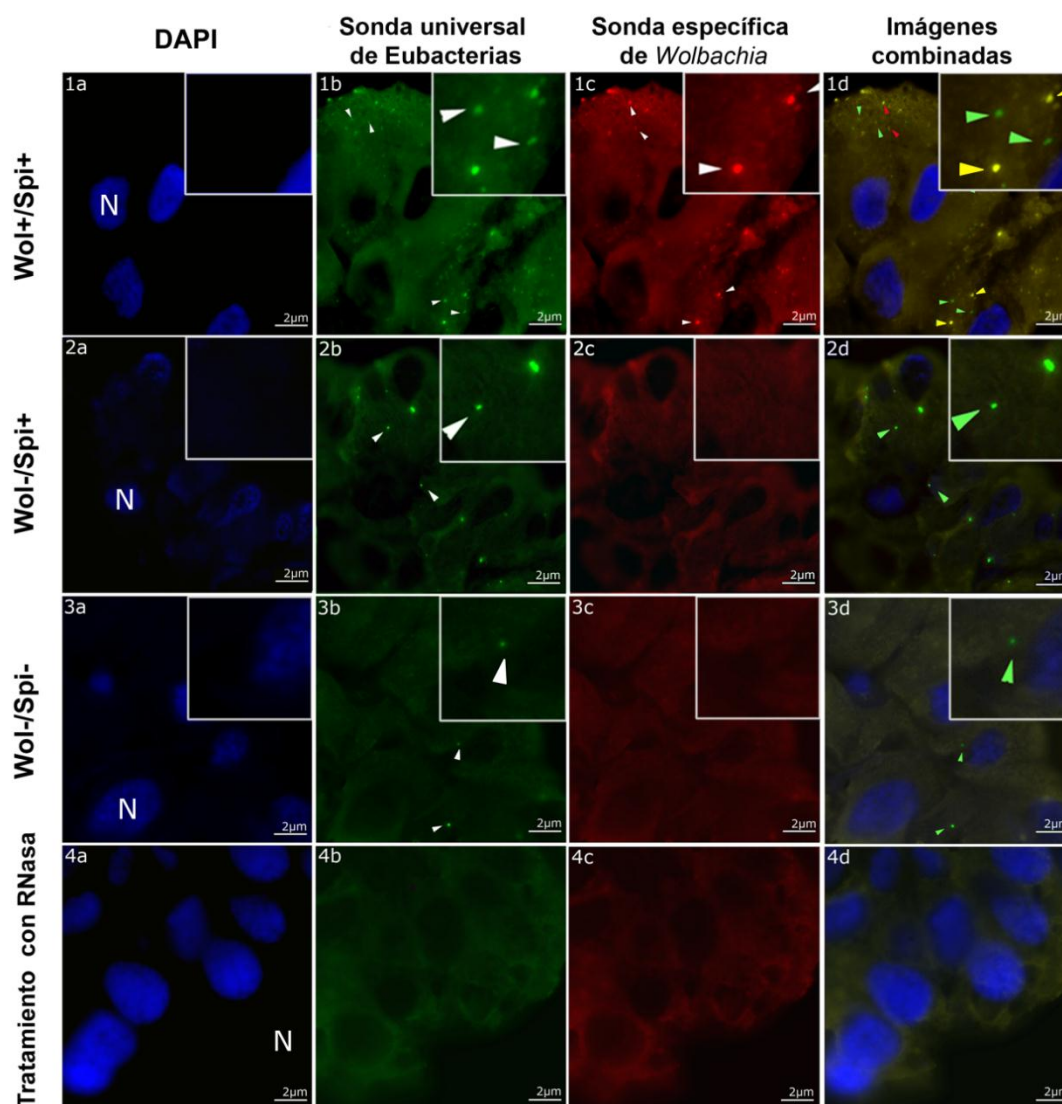


Fig. 75: Observación al microscopio de fluorescencia de cortes de tejido de la gónada femenina de individuos de *C. parallelus* tras la técnica de WCH. Puede observarse la hibridación en verde de la sonda universal para Eubacterias EU338-Fluoresceína. Esta sonda hibrida sobre cualquier bacteria presente en el tejido, incluida *Wolbachia*. La hibridación en rojo se corresponde con las sondas específicas de *Wolbachia*, *16S rRNA* y *wsp*. (1a-4d): Individuos infectados por *Wolbachia* y *Spiroplasma* (2a-2d): Individuos no infectados por *Wolbachia*, pero infectados por *Spiroplasma*. (3a-3d): Individuos no infectados ni por *Wolbachia*, ni por *Spiroplasma* (4a-4d): Control negativo adicional: tratamiento previo con RNasa.

En tercer lugar se utilizaron individuos no infectados por *Wolbachia*, ni tampoco por *Spiroplasma*, para valorar cuán importante era la señal de otros géneros bacterianos en el caso anterior. La sonda EU338-Fluoresceína hibridará sobre cualquier célula bacteriana presente en el tejido. Esperamos una señal muy baja, dado que la aparición de bacterias, a excepción de sus endosimbiontes naturales, indicaría una patología.

Efectivamente la señal de hibridación fue escasa. No existió hibridación de las sondas específicas de *Wolbachia*, de acuerdo con los resultados previos de PCR (Fig. 75, 3a-3d).

Estos datos apoyan los observados previamente en el ensayo DGGE. En este ensayo se comprobó que aquellos individuos infectados por géneros bacterianos menos frecuentes en las gónadas (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*...) presentaban menores intensidades en las bandas de PCR resultantes de amplificar el gen *16S rRNA*, respecto a aquellos infectados por *Spiroplasma* o *Wolbachia*. Pese a que no tiene carácter cuantitativo, se interpretó como que dichos individuos presentaban una menor densidad bacteriana, lo que podría relacionarse con las menores intensidades en la hibridación en tejido detectados en este nuevo ensayo.

Se realizó un control adicional, con el fin de descartar artefactos en la hibridación. Dado que éstas se unen de forma específica al ARN, cortes procedentes de los distintos individuos analizados fueron incubados con RNasa durante la noche previa a la hibridación,. Estos cortes se hibridaron en paralelo a los que no habían sido incubados. En todos los casos, se observó la ausencia de hibridación (Fig. 75, 4a-4d).

### **30.3 Detección de *Wolbachia* mediante WCH en aplastados de testículo de saltamontes.**

Como posible alternativa al método anterior, se realizó la hibridación de las mismas sondas sobre aplastados de testículo de *C. parallelus*. En este caso la señal de hibridación se distribuye a modo de un punteado aislado en el citoplasma bacteriano (Fig. 15, Fig. 71, Fig. 72 y Fig. 73). Si bien este método no nos aporta información espacial, podría emplearse como un sistema rápido de detección de *Wolbachia*, y que evitaría la inclusión del material en parafina y posterior manipulación. Se debe tener en cuenta que esta metodología altera sustancialmente la morfología celular. A su vez el propio proceso de hibridación, pese a la exclusión del SDS en la mezcla de hibridación modificada, se reveló muy agresivo sobre la muestra, desestructurándola. Esto suponía una pérdida considerable de la calidad del material, quedando las células y núcleos muy deteriorados y dificultando su observación y análisis. Sin embargo, la correcta hibridación



de la sonda sobre medios tan dispares, defiende la robustez de la técnica en sí misma, y respalda los resultados obtenidos.

## **31 TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE WOLBACHIA EN C. PARALLELUS**

### **31.1 Incidencia de parasitoides en *C. parallelus***

Se identificaron al menos 2 especies de parasitoides. El primero de ellos se identificó como una especie perteneciente al Phylum Nematomorpha, clase Gordioidea. En segundo lugar, se identificó una especie del Phylum Arthropoda, clase Insecta, orden Díptera y familia Tachinidae. Esta identificación fue posible gracias a la colaboración de la Dra. Ana García-Moreno (Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad Complutense de Madrid).

Se han observado diferencias notables en la incidencia de los distintos parasitoides descritos en *C. parallelus*. De las 40 poblaciones analizadas (Tabla B24 del anexo B), se han detectado parasitoides en 31 de ellas, por lo que la interacción entre *C. parallelus* y estas dos especies de parasitoides parece habitual. El “análisis de conglomerados de K medias”, sugiere la existencia de dos grupos de poblaciones (Fig. 76):

- (I) Poblaciones donde existe un alto porcentaje de nematomorfos, pero no existe parasitismo por parte de la familia Tachinidae.
- (II) Poblaciones en las que coexisten ambas especies de parasitoides, en frecuencias variables. La mayoría de las poblaciones se ubican en esta última categoría.

Así pues, aparentemente, existen poblaciones extremas, infestadas mayoritariamente por nematomorfos, tales como la población de Busmayor (León) o Biescas (Huesca), y en las que la incidencia es muy alta (39% de los individuos de Biescas están afectados, mientras que el porcentaje se eleva al 61% en el caso de Busmayor). En estos casos, en los que el parasitismo debido al Phylum Nematomorpha es tan acusado, no se han detectado casos de parasitismo por tachínidos, si bien no puede descartarse.



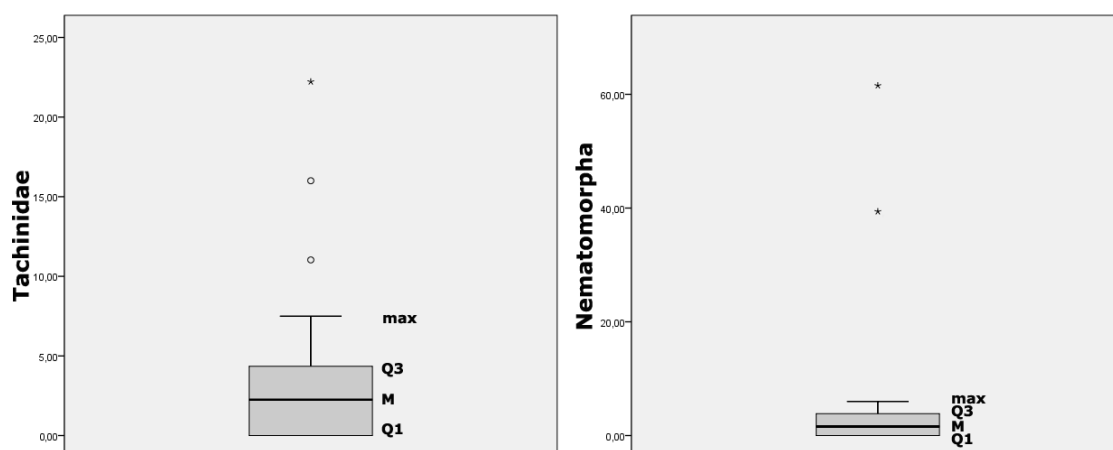


Fig. 77: a) Incidencia media (%) de la familia Tachinidae en las distintas poblaciones analizadas de *C. parallelus*. b) Incidencia media (%) del *Phylum* Nematomorpha en las distintas poblaciones analizadas de *C. parallelus*. Los gráficos indican la mediana (M), los cuartiles 1 y 3 (Q1 Y Q3), así como el máximo. Los círculos indican los puntos atípicos, definidos como observaciones que son “numéricamente distantes del resto de los datos” en el sentido que superan la media  $\pm 3S$  y el \*, puntos extremos, definidos como aquellos, que superan la media  $\pm 5S$ .

En el caso de la familia Tachinidae, se han observado diferencias significativas en la incidencia de dicho parasitoide a lo largo de los años muestreados en las poblaciones de *C. Tourmont* ( $G=36,578$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ), *Escarrilla* ( $G=13,695$ ; g.l.=4;  $p=0,008$ ), *Gabas* ( $G=19,605$ ; g.l.=4;  $p=0,001$ ) y *Sallent de Gállego* ( $G=23,470$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ). En el resto de poblaciones, las diferencias han sido más suaves, o bien el tamaño muestral no ha sido suficiente para dar soporte estadístico a dichas diferencias.

En el caso de la clase Gordioidea, se han observado diferencias significativas en su incidencia a lo largo de los años en las poblaciones de *Biescas* ( $G=23,918$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ), *C. Antigua* ( $G=13,212$ ; g.l.=4;  $p=0,010$ ), *C. Tourmont* ( $G=27,940$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ), *L’Hermine* ( $G=27,007$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ), *Sallent de Gállego* ( $G=29,591$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ), y *Soques* ( $G=10,123$ ; g.l.=4;  $p\approx 0,000$ ). En el resto de poblaciones, las diferencias han sido más suaves, o bien el tamaño muestral no ha sido suficiente para dar soporte estadístico a dichas diferencias.

### 31.2 Infección por *Wolbachia* en la familia Tachinidae.

Con el fin de detectar una posible vía de transmisión horizontal de *Wolbachia*, se ha analizado la infección por *Wolbachia* en individuos de la familia Tachinidae, detectados durante la disección de su hospedador habitual, *C. parallelus*.

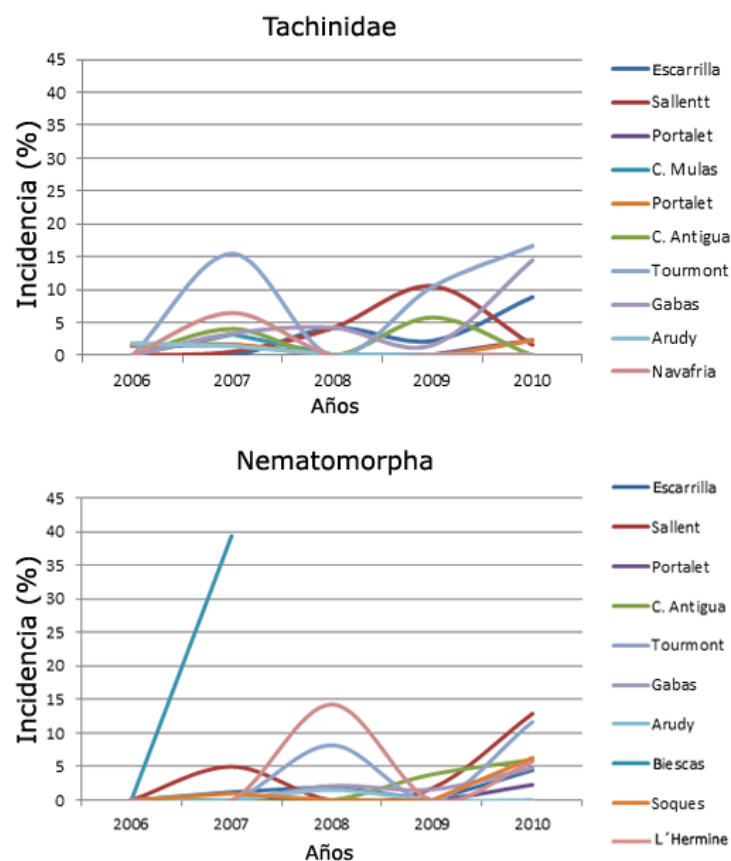


Fig. 78: Variación en porcentaje de las frecuencias de infestación por tachínidos y nematomorfos a lo largo de varios años.

El análisis por PCR del ADN extraído a partir de los cuerpos de los parasitoides, permitió detectar la infección por *Wolbachia*, y en su caso, su caracterización. Para calcular las frecuencias de infección globales, así como para valorar la importancia de esta vía de transmisión de la bacteria, se han incluido todos los casos detectados, sin considerar la población en la que fueron muestreados.

Se detectó la infección por *Wolbachia* en un total de 27 individuos de esta familia de dípteros (de los 148 analizados), lo que supone una infección del 18% de los individuos muestreados. Si analizamos los distintos tipos de infección, se observa que un 4% de los individuos presentaron infección por el supergrupo F de *Wolbachia*, un 3,3% estaban infectados por el supergrupo B, y un 10,8% presentaron una infección múltiple por los supergrupos F y B. Las frecuencias absolutas se muestran en la Tabla 15

La Fig. 79 representa el número de casos caracterizados (frecuencias absolutas) en relación a la infección del hospedador en el que fue detectado el parasitoide. Cabe destacar varios tipos de casos, en función a la información que nos suministran:

		Infección en el Tachínido				Total
		No infectado	Infectado por F	Infectado por B	Coinfectado	
Infección en <i>C. parallelus</i>	No infectado	71	0	3	0	74
	Infectado por F	17	6	0	10	33
	Infectado por B	17	0	1	3	21
	Coinfectado	16	0	1	3	20
	Total	121	6	5	16	148

Tabla 15: Frecuencias absolutas para la infección detectada en el parasitoide y su hospedador.

- (i) La infección por *Wolbachia* es exclusiva del parasitoide. Esta infección no puede proceder del hospedador en el que se encontraba el parasitoide, sino que debe ser fruto de la transmisión vertical de *Wolbachia* en esta especie de parasitoide. El origen de esa infección debe ser la hembra parasitoide que ha puesto sus huevos en el ortóptero. Esto implicaría que *Wolbachia* infecta al parasitoide y además, potencialmente, se transmite a su descendencia (y al hospedador). Se han detectado 3 casos.
- (ii) El hospedador está infectado, pero el parasitoide está infectado por una infección diferente, de tal modo que, al igual que en el caso anterior, la infección “propia” del parasitoide no puede proceder del ortóptero al que parasitaba. Debe proceder de la hembra que puso sus huevos en el saltamontes. Esto implica que se pueden producir fenómenos de transmisión horizontal en uno u otro sentido. Se han detectado 13 casos.
- (iii) El hospedador está coinfectado, pero el parasitoide sólo presenta infección por una de las cepas. Este caso también alimenta la posibilidad de transmisión horizontal, si bien, no puede descartarse la contaminación cruzada. Se ha detectado un caso.
- (iv) La infección por *Wolbachia* es la misma en el hospedador y el parasitoide. Estos casos también podrían suponer procesos de transmisión horizontal, aunque también son los más sospechosos de contaminación cruzada. Se han detectado un total de 10 casos.
- (v) El hospedador está infectado, pero el parasitoide no está infectado. Estos casos son un buen control de que la metodología utilizada evita las contaminaciones cruzadas. Se han detectado un total de 50 casos.

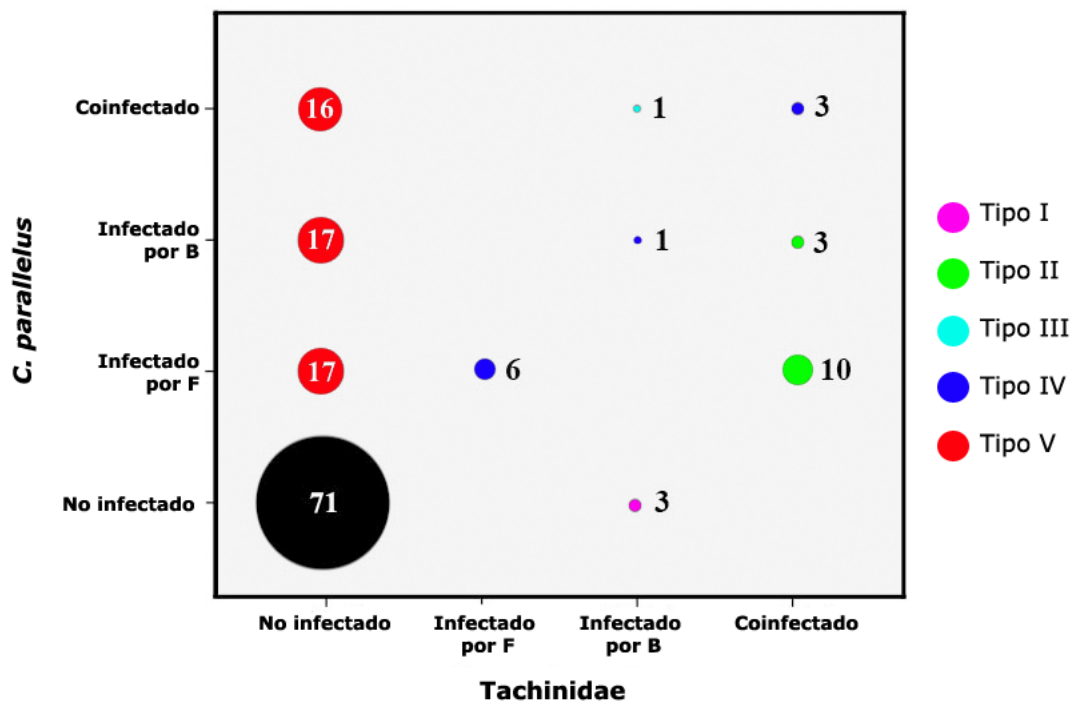


Fig. 79: Infección de hospedadores y parasitoides. Los colores nos indican el “tipo” de caso, en función de lo mencionado en el texto.

### 31.2.1 Caracterización molecular de las cepas de *Wolbachia* que infectan a la familia Tachinidae.

Gen 16S rRNA.

En primer lugar se amplificaron y secuenciaron las cepas de *Wolbachia* que infectaban a 6 saltamontes de la población de Navafría detectados durante el año 2005, así como a sus respectivos parasitoides, todos ellos pertenecientes a la familia Tachinidae. Se seleccionaron estos 6 casos debido a que se cumplía la condición de que la infección por *Wolbachia* fuese única, no existiendo coinfección, con el fin de evitar señales dobles durante la secuenciación.

Para comprobar si las cepas F y B de *Wolbachia* que infectan a *C. p. erythropus* eran exactamente las mismas que infectan al parasitoide, se amplificó y secuenció el fragmento de 1300 pb del gen 16S rRNA de la cepa F y de la cepa B de *Wolbachia* detectada en individuos de *C. parallelus* de la población *C. p. erythropus* de Navafría (Sistema Central). Este producto se secuenció en ambas direcciones con el fin de que las secuencias pudieran ser alineadas en su parte central y confirmar cualquier cambio de una base por otra. Dichas secuencias se compararon con las obtenidas a partir de los parasitoides asociados a dichos individuos infectados también por *Wolbachia*.



Las secuencias obtenidas en los individuos de *C. parallelus* se compararon con las cepas previamente caracterizadas en esta población (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b) confirmándose que no existían variantes. A su vez, la comparación con las cepas, tanto del supergrupo F como del supergrupo B, detectadas en los parasitoides, confirmó que las cepas detectadas en estos dípteros son las mismas que se habían detectado previamente en *C. parallelus*.

#### *Sistema de Clasificación de cepas Multilocus.*

A su vez se amplificaron y secuenciaron los 5 genes pertenecientes al Sistema de Clasificación de Cepas Multilocus (MLST), así como el gen *wsp*. La elección de estos individuos tuvieron en cuenta dos criterios (i) los parasitoides están infectados por una única cepa de *Wolbachia* de acuerdo con los datos de la amplificación por PCR del gen *16S rRNA* para evitar señales dobles en las secuencias, y (ii) el hospedador no está infectado por *Wolbachia*, o si no es posible, al menos el hospedador presenta una infección distinta (distinto supergrupo) que el parasitoide, con el fin de evitar las sospechas de una posible contaminación experimental de ADN del hospedador en el parasitoide. Estos requisitos limitaron el número de secuencias analizadas, sin embargo permiten descartar contaminaciones cruzadas.

Se analizaron las secuencias obtenidas a partir de un 1 tachínido infectado por el supergrupo B detectado en un individuo híbrido de *C. parallelus* perteneciente a la población de Portalet, cuyo hospedador no estaba infectado por *Wolbachia*. A su vez, se repitió este procedimiento con otros 2 tachínidos. El primero, perteneciente a la población de Sallent de Gállego, estaba infectado por el supergrupo B de esta bacteria. Su hospedador estaba infectado por *Wolbachia*, pero con una infección diferente al parasitoide. En este caso, se trataba de un individuo coinfectado. En segundo lugar, se analizó a un tachínido infectado por el supergrupo F de *Wolbachia* cuyo hospedador fue muestreado en la población de Puerto Cantó. En este caso, no fue posible seleccionar ningún individuo cuyo hospedador estuviese infectado por otra tipología de infección.

A su vez, estas secuencias fueron comparadas con las secuencias para las cepas F y B de *Wolbachia* caracterizadas en la población correspondiente de saltamontes. Las cepas caracterizadas en los distintos dípteros analizados en las distintas poblaciones (Portalet, Sallent y Puerto Cantó), coinciden con las cepas descritas infectando a *C. parallelus* en esas poblaciones (Ver sección “Filogenia y filogeografía de *Wolbachia*”, pág. 248). La Tabla 16 detalla los alelos detectados para cada uno de los genes.

Gen	Población del parasitoide		
	Portalet	Sallent	Pto. Cantó
hcpA	≈H5	H2	H8
coxA	H2	H2	H4
ftsZ	H1	H1	H5
fbpA	H3	H3	H1
gatB	?	H3	H5
wsp	?	H1	H5

Tabla 16. Alelos de *Wolbachia* descritos en los tachinidos analizados. En el caso del gen *HcpA* se detectó una secuencia similar al alelo H5 detectado previamente, si bien presentaba 2 cambios relevantes. El cambio de una C por T en la posición 144, así como un cambio de T por C en la posición 300. En el caso del gen *gatB*, la secuencia correspondiente al parasitoide de la población pirenaica de Portalet no pudo determinarse el alelo, debido a que el cromatograma presentó múltiples señales dobles. En el caso del gen *wsp*, el alelo detectado en el parasitoide muestreado en Sallent de Gállego (zona híbrida) se correspondía con el alelo H1 detectado previamente en varias poblaciones de *Chorthippus parallelus*, y equivalente a la cepa de *Wolbachia* detectada en *Podisma tyatiensis* (genbank JF730718). Por otro lado, tampoco se pudo caracterizar la secuencia de *Wolbachia* correspondiente al individuo muestreado en Portalet, debido a la doble señal detectada en el cromatograma de esta secuencia. Esto abre una posible doble infección por varias cepas pertenecientes al supergrupo F.

### 31.3 Infección por *Wolbachia* en el *Phylum* Nematomorpha.

A continuación se presentan los datos obtenidos del análisis de la infección de los nematomorfos aislados a partir de individuos de *C. parallelus*, en relación a la infección detectada en el saltamontes (Tabla 18).

		Infección en el Nematomorfo				Total
		No infectado	Infectado por F	Infectado por B	Coinfectado	
Infección en <i>C. parallelus</i>	No infectado	41	1	0	0	42
	Infectado por F	13	9	0	1	23
	Infectado por B	10	0	3	1	14
	Coinfectado	12	1	1	16	30
	Total	76	11	4	18	109

Tabla 17: Frecuencias absolutas de los nematomorfos infectados por *Wolbachia*, en relación a la infección detectada en *C. parallelus*.





Al igual que ocurría en el caso anterior, podemos distinguir entre varios tipos de casos (Fig. 80):

- (i) La infección por *Wolbachia* es exclusiva del parasitoide. Esta infección no puede proceder del hospedador en el que se encontraba el parasitoide, sino que debe ser fruto de la transmisión vertical de *Wolbachia* en esta especie de parasitoide. El origen de esa infección debe ser la hembra del parasitoide que ha puesto sus huevos en el ortóptero. Esto implicaría que *Wolbachia* infecta al parasitoide y además se transmite potencialmente a su descendencia (y al hospedador). Se han identificado 2 casos.
- (ii) Hospedador y parasitoide están infectados por una infección diferente de tal modo que, al igual que en el caso anterior, la infección “propia” del parasitoide no puede proceder del ortóptero al que parasita, y proviene de la hembra que puso los huevos en el saltamontes. Esto implica la posibilidad de fenómenos de transmisión horizontal en uno y otro sentido, que expliquen, quizás, la coinfección por ambas cepas de *Wolbachia*. Se ha detectado 1 caso.
- (iii) El hospedador está coinfectado, pero el parasitoide sólo presenta infección por una de las cepas. Este caso también puede interpretarse a la luz de la transmisión horizontal, si bien, no pueden descartarse contaminaciones cruzadas. Se han caracterizado 2 casos.
- (iv) La infección por *Wolbachia* es la misma en el hospedador y el parasitoide. Estos casos podrían suponer procesos de transmisión horizontal, si bien, son aquellos en los que una posible contaminación cruzada es más posible. Se han descrito un total de 28 casos.
- (v) El hospedador está infectado, pero el parasitoide. Estos casos son un buen control de que la metodología utilizada evita las contaminaciones cruzadas. Se han detectado un total de 35 casos.

### **31.3.1 Caracterización molecular de las cepas de *Wolbachia* infectando al *Phylum Nematomorpha*.**

En este caso, se amplificaron y secuenciaron las cepas de *Wolbachia* que infectaban a 2 individuos del *Phylum Nematomorpha* de las poblaciones de Escarrilla y Valdieri.

La elección de estos individuos, al igual que en el apartado anterior, tuvo en cuenta dos criterios: (i) que los parasitoides estuvieran infectados por una única cepa de *Wolbachia* (de acuerdo con los datos de la amplificación por PCR del gen *16S rRNA*), para evitar señales dobles en las secuencias, y (ii) el hospedador no estuviera infectado por *Wolbachia*. Si esto no era



posible, al menos el hospedador presentaba una infección distinta que el parasitoide, con el fin de evitar las sospechas de una posible contaminación experimental de ADN del hospedador en el parasitoide. Esto limitó el número de sucesos analizados:

En el primer caso, se analizó un nematomorfo detectado en la población de Escarrilla y cuyo hospedador no estaba infectado por *Wolbachia*. Dado que no existían más individuos que cumplieran los criterios comentados anteriormente, se optó por amplificar la cepa de *Wolbachia* que infectase a un segundo parasitoide, un nematomorfo detectado en la población de Valdieri (Alpes), pese a que el hospedador sí estaba infectado por *Wolbachia*.

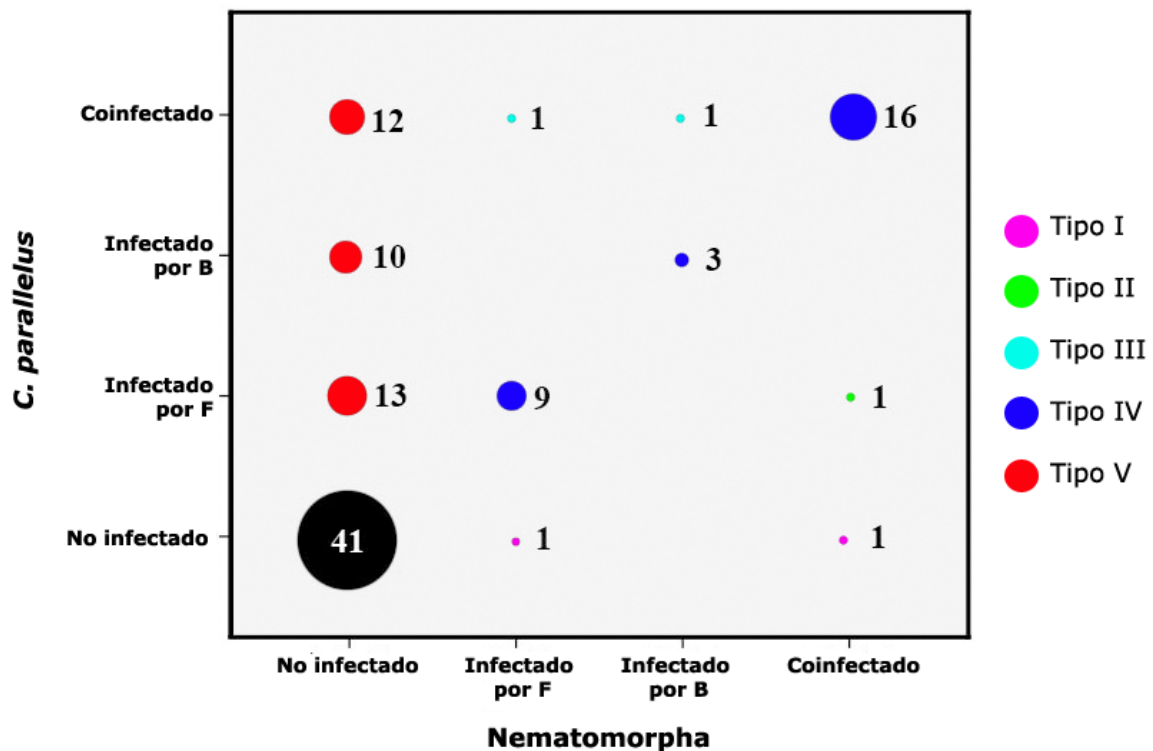


Fig. 80: Infección de hospedadores y parasitoides. Los colores nos indican el “tipo” de caso, en función de lo mencionado en el texto.

A su vez, estas secuencias fueron comparadas con las de las cepas F y B de *Wolbachia* caracterizadas en la población correspondiente. Como en el caso anterior, las cepas de *Wolbachia* descritas en los parasitoides, coincidieron con las que previamente habían sido descritas en individuos de *C. parallelus* capturados en las poblaciones donde estos parasitoides se aislaron. La Tabla 18 detalla los alelos detectados:

Gen	Población del parasitoide	
	Escarrilla	Valdieri
hcpA	H6	H5
coxA	H4	H7
ftsZ	H5	≈H1
fbpA	H1	otros*
gatB	H4	≈H1
wsp	H3	H1

Tabla 18: Frecuencias absolutas de los nematomorfos infectados por *Wolbachia*, en relación a la infección detectada en *C. parallelus*. En el caso del gen *ftsZ*, la secuencia del nematomorfo muestreado en la población de Valdieri (Alpes), coincidió con el alelo H1, salvo en una posición en la que hay un cambio de A>C. En el caso del gen *ftsZ* dispusimos de una secuencia adicional, correspondiente a un nematomorfo muestreado en la población de C. Tourmont (vertiente francesa de la zona híbrida). Su secuencia era similar al alelo H1, pero presentaba 3 cambios destacables (cambio de C por T en las posiciones 125 y 213; cambio de G por A en la posición 288 del alineamiento). En el caso del gen *fbpA*, la secuencia caracterizada en el parasitoide detectado en la población de Valdieri, no era equivalente a ninguno de los alelos caracterizados para este gen en *C. parallelus*. \*Las secuencias más próximas en la base de datos se corresponde con las cepas de *Wolbachia* detectadas en varias avispas parásitas, como *Tetrastichus coeruleus* y *Trichogramma brassicae*, así como varias especie de mariposas, tales como *Ostrinia scapularis*, *Libythea myrrha* o *Anthene emolus*. En el caso del gen *fbpA* dispusimos de nuevo de una secuencia adicional, correspondiente al mismo nematomorfo mencionado anteriormente y que fue muestreado en la población de C. Tourmont. Su secuencia era similar al alelo H3, con un único cambio en la posición 49, cambio de una G por una A. En el caso Gen *gatB* del parasitoide muestreado en la población de Valdieri, se detectó una secuencia similar al alelo 1, con dos posiciones variables, la posición 118, en la que se produjo una sustitución de G por A, y la posición 237, en la que se produjo una sustitución de A por G. El gen *wsp* detectado en Valdieri se correspondía con el alelo H1 detectado previamente en *Chorthippus parallelus* (genbank FJ625795), y equivalente a la cepa de *Wolbachia* detectada en *Podisma tyatiensis* (genbank JF730718).

### 31.4 Caracterización de la infección por *Wolbachia* en otras especies de ortópteros.

Con el fin de valorar la hipótesis de una posible transmisión horizontal de *Wolbachia* entre especies de hospedadores distintas, se analizó y caracterizó la infección por este endosimbionte en varias especies de ortópteros que coexisten con *C. parallelus*: *Antaxius chopardi* (Tettigoniidae), *Arcyptera fusca*, *Podisma pedestris*, *Oedipoda caerulea*, *Oedipoda germanica*, *Ruspolia nitidula*, *Chorthippus vagans* y *Euchorthippus chopardi*, comprobándose si éstas estaban o no infectadas por *Wolbachia* y, en su caso, la cepa bacteriana.

En todos los casos en los que se detectó infección por *Wolbachia*, ésta se correspondía con el supergrupo B. En el caso de los individuos de *Ruspolia nitidula*, *Chorthippus vagans*, *Euchorthippus chopardi* capturados en las poblaciones de Arudy y Tourmont, la secuenciación del gen ribosómico 16S rRNA permitió determinar que la cepa que infectaba a estas especies era la misma que aparecía en *C. parallelus*.

En el caso de *Podisma pedestris*, la secuenciación de los genes pertenecientes al MLST permitió corroborar que las cepas pertenecientes al supergrupo B de ambos ortópteros son muy similares. La Fig. 81 muestra la posición filogenética de los ST detectados en *P. pedestris* respecto al ST 6 de *C. parallelus*. Los detalles de este estudio, aun preliminar y realizado en colaboración con el Prof. Richard Nichols (QMWC, University of London), no se han incluido en esta tesis doctoral.

En el caso de las especies *Oedipoda caerulea*, *Oedipoda germanica* y *Euchorthippus chopardi* capturadas en la población de Escarrilla, no se detectó infección por *Wolbachia*.

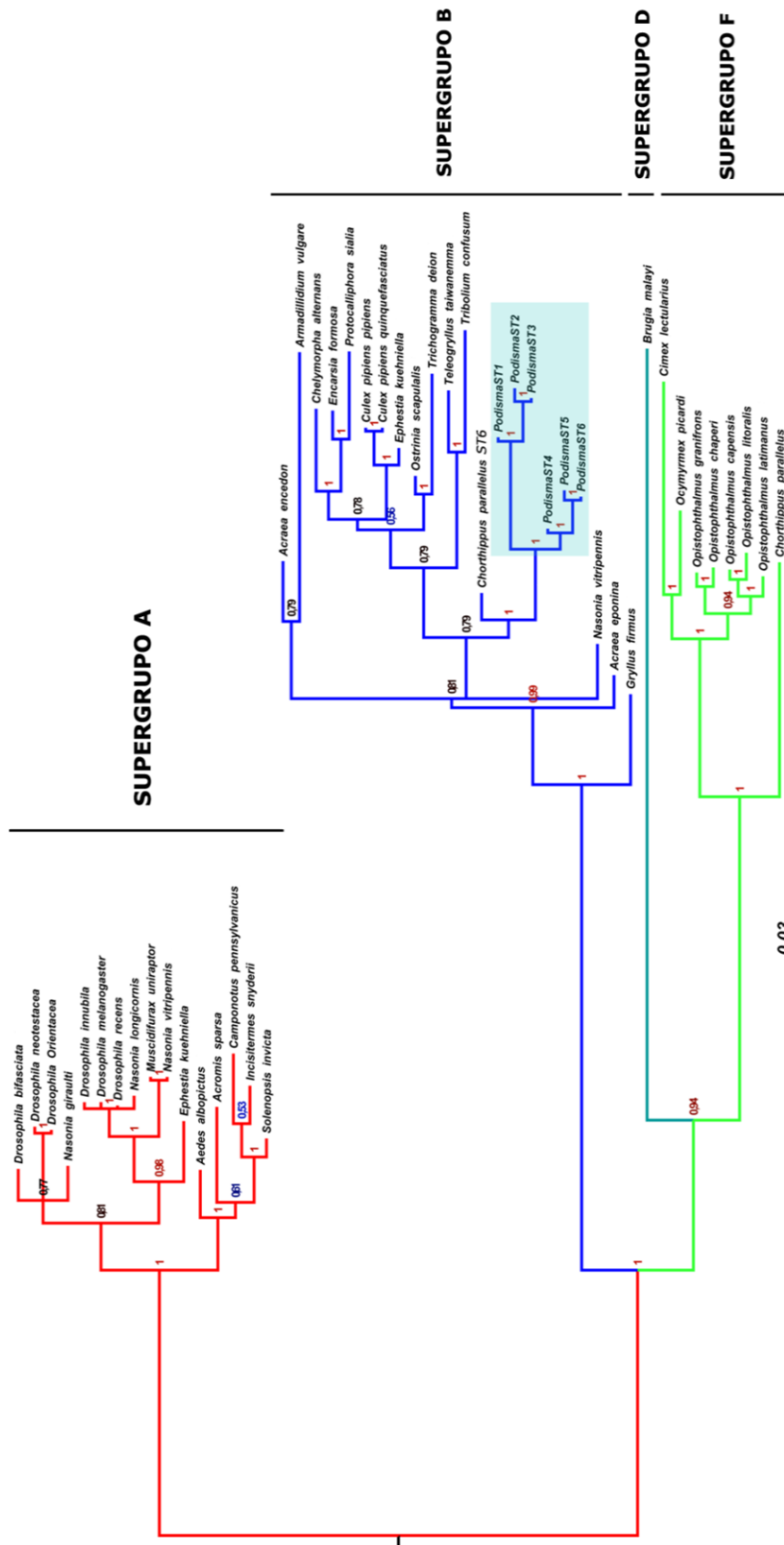


Fig. 81: Árbol filogenético no enraizado, obtenido mediante inferencia bayesiana, a partir de los ST detectados en distintos organismos, incluidos *C. parallelus* y *Podisma pedestris* (resaltados en azul).





# DISCUSIÓN.

## 32 INFECCIÓN DE *WOLBACHIA* EN *C. PARALLELUS*. FRECUENCIAS DE INFECCIÓN.

### 32.1 Variación interanual de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*.

La infección por *Wolbachia* es generalizada en *C. parallelus*. Independientemente del grado de infección y de la cepa responsable, todas las poblaciones muestreadas presentan cierto grado de infección por este endosimbionte. Sin embargo las diferencias entre poblaciones son notables, asociándose el predominio de un determinado supergrupo y unas frecuencias de infección a grandes regiones geográficas. A su vez, existe una relación clara entre la infección actual y los patrones de expansión poblacional del hospedador tras las glaciaciones, al menos en el caso del supergrupo F de esta bacteria, una de las responsables de la infección. Los patrones de infección en base a los supergrupos responsables, son respaldados por el resto de análisis, esta vez a nivel molecular, realizados según el tipo de cepa responsable dentro de cada supergrupo.

Por otro lado, en general no se observan diferencias entre sexos, salvo casos puntuales. No se han detectado poblaciones donde estas diferencias sean recurrentes a lo largo de los muestreos, lo que apoyaría que se tratara de variaciones erráticas, fruto de condiciones ambientales y/o experimentales. Una de las explicaciones para que existiesen diferencias en la infección entre machos y hembras, sería que *Wolbachia* afectase al *sex-ratio* en estos organismos (por ejemplo causando la muerte selectiva de los machos o partenogénesis), sin embargo no se han observado evidencias de que haya diferencias recurrentes en la infección entre hembras y machos. Las diferencias observadas en algunas poblaciones de forma puntual parecen achacables a sesgos de muestreo, o variaciones erráticas, por lo que en principio se descartaría este fenotipo bacteriano. A su vez, esta especie de ortóptero nunca ha sido descrita como partenogenética.

La estabilidad de este patrón geográfico, y las actuales frecuencias de infección son puntos importantes del estudio. Necesitamos saber si las frecuencias detectadas son estables, para poder sacar conclusiones sobre la dinámica de la infección y su influencia en la estructuración y diferenciación de las poblaciones de *C. parallelus*. Unos patrones cambiantes en el tiempo, implicarían necesariamente, que las conclusiones actuales sobre el papel de

*Wolbachia* en la diferenciación de las poblaciones de *C. parallelus* quedarían al menos parcialmente invalidadas.

Para ello, se analizaron durante años sucesivos las poblaciones de la zona híbrida, con el fin de llevar un registro de los cambios interanuales en las frecuencias de infección. El objetivo era evaluar las diferencias entre años sucesivos, y detectar en su caso, la tendencia general de la infección a corto plazo. Para ello se continuaron los muestreos realizados desde 2002. Nuestros resultados muestran variaciones erráticas de la infección en varias poblaciones, si bien pese a estos aumentos y disminuciones de las frecuencias de infección, existe una tendencia general a mantenerse dentro de cierto rango de valores. Por contra, existen poblaciones en las que estos cambios no son significativos, y se mantienen estables tras varios años de registro.

Hay que tener en cuenta que al trabajar con poblaciones naturales, éstas se ven sometidas a múltiples factores ambientales no controlados, cuyo efecto en *Wolbachia* no se conoce (temperatura, humedad ambiental, lluvia promedio...). Por otra parte, existen factores demográficos que pueden ser muy relevantes (cambios en el tamaño efectivo de la población como consecuencia de cambios climáticos u otros factores...), así como la interacción de estas poblaciones con el resto de especies en su entorno, incluidos depredadores y parásitos. Todos estos factores hacen suponer que existan cambios en las frecuencias de infección entre distintos años, sin que estos afecten a la estabilidad de la infección en sí, que tenderá a mantenerse en torno a ciertos valores en función de su capacidad de inducir incompatibilidad citoplasmática, su capacidad de transmitirse a la siguiente generación, así como su posible efecto sobre la fertilidad de las hembras. Esto daría lugar a patrones como los observados, donde descensos en los niveles de la infección van seguidos de incrementos, y viceversa.

Pese a que se han monitorizado las distintas poblaciones de la zona híbrida durante varios años, hay que ser conscientes de las limitaciones que tiene este estudio para valorar la estabilidad de la infección a largo plazo. Por ello se han realizado simulaciones matemáticas de 4.000 generaciones, utilizando para ello el modelo de dinámica poblacional propuesto por Vautrin *et al.* (2007), tras modificar la matriz  $M_{ci}$ , acorde con lo expuesto en la sección de Material y Métodos. Se han propuesto como datos de partida las frecuencias de infección medias de las poblaciones pirenaicas de Escarrilla, Sallent y Arudy, considerándose éstas características de cada uno de los patrones geográficos propuestos previamente por Zabal-Aguirre *et al.* (2010).

Estas simulaciones permiten observar que las poblaciones de Escarrilla y Arudy mantendrían su infección mayoritaria (supergrupo F y B respectivamente) para un rango amplio de parámetros, lo que nos indica cierta estabilidad de la infección. Arudy incluso incrementaría





sus niveles de infección por el supergrupo B. Por contra, la población de Sallent no parece mantener los altos niveles de coinfección salvo en condiciones de alta transmisión y alta incompatibilidad bidireccional. Estos datos son aun preliminares, y consideran únicamente la dinámica aislada de las poblaciones, sin tener en cuenta la migración entre éstas, u otros factores demográficos, ambientales o relacionados con el sistema inmune del hospedador.

Para que *Wolbachia* pueda tener un papel relevante en la dinámica de la zona híbrida de *C. parallelus*, la estabilidad temporal debe asociarse con cierta estructuración geográfica. El papel de *Wolbachia* para influir en la dinámica de la zona híbrida está basado en su capacidad para inducir incompatibilidad tanto unidireccional, como bidireccional, entre individuos que presenten distinto estatus de infección. Esto no ocurriría si la infección en las poblaciones fuese homogénea a lo largo del transecto.

### **32.2 Patrones diferenciales de infección en la zona híbrida.**

El análisis de las distintas poblaciones de *C. parallelus* a lo largo de la zona híbrida, ratifica los resultados presentados por Zabal-Aguirre *et al.* (2010), observándose un gradiente norte-sur a lo largo del transecto. Las poblaciones del extremo francés de la zona híbrida presentaban tasas bajas de infección, siendo ésta mayoritaria por el supergrupo B, mientras que las poblaciones del extremo español presentan tasas altas de infección, en concreto por el supergrupo F. Rompiendo este gradiente encontramos a la población de Sallent de Gállego, con altas tasas de coinfección. Este patrón estructural, se extiende más allá del Pirineo, como veremos más adelante.

Estos autores, sugerían que el gradiente fuese fruto de eventos independientes de infección, si bien consideraban que sus datos no eran suficientes para poder descartar otras hipótesis, como gradientes ambientales. Tras corroborar los patrones de infección en cada uno de estas poblaciones y confirmar molecularmente los patrones de infección diferencial mediante el MLST, podemos apoyar que (i) en su origen, las infecciones de *C. parallelus* por los supergrupos F y B fueron efectivamente dos sucesos independientes, posiblemente en momentos distintos (ver más adelante sección "El origen de la infección en *C. parallelus*", pág. 271), y (ii) que el modelo actual de infección es fruto del contacto secundario entre dos subespecies cuyo patrón de infección, entre otros caracteres, era distinto. Estos resultados, discutidos más adelante, a su vez apuntan a que *Wolbachia* estuvo presente durante la formación de la zona híbrida, y que por tanto pudo influir en su dinámica ya desde el inicio.

Sin duda, la población más característica a lo largo del transecto es Sallent de Gállego, cuyos niveles de coinfección la diferencian del resto de poblaciones de *C. parallelus*. Existen otras poblaciones (en la Península Ibérica), con frecuencias de coinfección elevadas, pero nunca tan altas como en este caso.

Este patrón de coinfección se ha relacionado con la caída brusca en la frecuencia de determinados marcadores citogenéticos (Fig. 82), como la banda heterocromática P del cromosoma X (propia de Cpp) en esta región. Zabala-Aguirre *et al.* (2010) apuntaron a que el incremento de la coinfección (por selección a favor de los individuos coinfectados) podría haber favorecido la fijación de determinados factores citoplasmáticos propios de Cpe, incompatibles con la banda P, característica de Cpp (Virdee & Hewitt, 1992). Esto explicaría porqué este marcador citogenético disminuye su frecuencia en torno a la población de Sallent de Gállego. Esta estructuración de las poblaciones tendría una gran relevancia en la dinámica de la zona híbrida, debido a las incompatibilidades generadas. Sin embargo, aunque esta hipótesis explicaría la disminución de la frecuencia de la banda P como consecuencia indirecta de un incremento de la coinfección, no revela el motivo por el cual se incrementan los niveles de coinfección de forma específica en esta población.

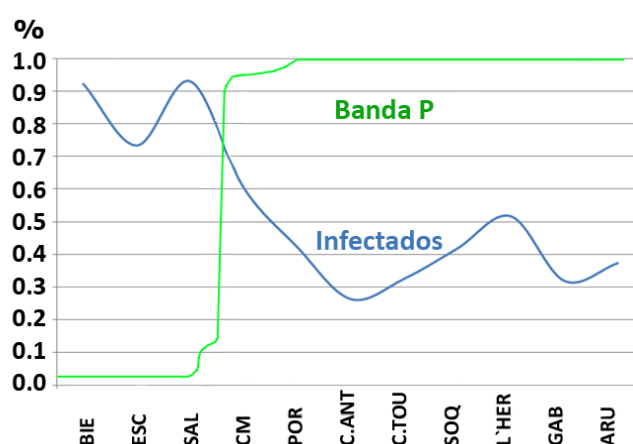


Fig. 82: Esquema mostrando el acoplamiento parcial entre la clina establecida para las frecuencias de la banda heterocromática P del cromosoma X, y la frecuencias de infección por *Wolbachia*.

Los distintos modelos matemáticos que explican la dinámica de *Wolbachia* a lo largo del tiempo defienden un incremento de la coinfección, debido a la ventaja adaptativa que presentarían las hembras co-infectadas frente al resto de hembras de la población, en condiciones donde existiese incompatibilidad citoplasmática bidireccional. Sin embargo, las estimas realizadas en *C. parallelus*, muestran unos índices de  $H_{BI}$  suaves (Zabala-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010) que, en principio, no parecen apuntar a la estabilización de la

coinfección en esta población (ver simulaciones matemáticas) salvo que existan unos niveles de transmisión vertical extremadamente altos, cercanos al 100% de descendientes infectados. De ahí que deba existir otra fuerza evolutiva/demográfica que favorezca esta situación.

De hecho, no debe descartarse la hipótesis de que las tasas de coinfección en Sallent de Gállego sean fruto de la deriva genética u otros eventos demográficos, pese a que los modelos de dinámica poblacional en los que se han incluido procesos estocásticos, generalmente no presentan resultados muy diferentes de los modelos deterministas a la hora de predecir la infección por *Wolbachia* en una población (Branca *et al.*, 2009).

Un aspecto que puede ser interesante considerar en la estructuración poblacional, así como en la dinámica de la expansión de la infección a poblaciones cercanas, sería el efecto que tendría la endogamia en las poblaciones del hospedador. El estudio de la estructura poblacional de *C. parallelus* basada en el análisis de microsatélites (Sarasa, 2013) mostraba la existencia de endogamia en estas poblaciones. Por su parte, los modelos sobre la dinámica de *Wolbachia* propuestos por Branca *et al.* (2009) defendían que la presencia de endogamia en el hospedador, conjuntamente con la aparición de caracteres nucleares seleccionados positivamente en dicha población y asociados a la infección, podría favorecer el mantenimiento de tasas elevadas de infección, a la vez que dificultaba la expansión de la infección a poblaciones cercanas.

En el caso concreto de Sallent de Gállego, la selección de caracteres propios de la subespecie Cpe en el extremo español de la zona híbrida, asociada a la infección F de *Wolbachia*, podrían explicar sus altos índices de infección observados en la actualidad. La aparición de la coinfección en esta localización podría estar relacionada con que esta población supone el punto de contacto entre el supergrupo F ibérico, y el supergrupo B presente en las poblaciones del extremo francés de la zona híbrida. Un incremento de las tasas de infección de uno de los supergrupos, podría arrastrar al otro supergrupo una vez que se generara la coinfección, facilitando su transmisión en un nuevo hospedador (Vautrin *et al.*, 2007; Vautrin *et al.*, 2008). Este *sweep* evolutivo, podría a su vez fijar en *C. parallelus* los caracteres citoplasmáticos/nucleares a los que se asocie la infección (Zabal-Aguirre *et al.* 2010).

### **32.3 “The coupling hypothesis”.**

Como hemos comentado, es destacable el aparente acoplamiento existente entre las clinas de distintos marcadores citogenéticos (incluida la banda P), y aquellas que describen la transición de la infección entre subespecies.



Este efecto de acoplamiento ha sido previamente observado afectando a barreras endógenas, incompatibilidades entre poblaciones debido a alelos independientes del hábitat o por aislamiento prezigótico. La formación de una zona de tensión tras el restablecimiento del contacto entre poblaciones sería el ejemplo más evidente. También puede asociarse a barreras exógenas (grupos de alelos adaptados a hábitats diferentes), y barreras geográficas (asociadas generalmente a zonas de baja densidad poblacional (Barton, 1979; Barton & Hewitt, 1985). Bierne *et al.* (2011) se refieren a este fenómeno como *The coupling hypothesis*.

Se ha observado que las zonas de tensión generadas como consecuencia de barreras endógenas pueden ser inestables y desplazarse espacialmente hasta encontrar una barrera geográfica donde fijarse (Barton, 1979; Barton & Hewitt, 1985; Hewitt, 1988b), lo que daría lugar al acoplamiento de factores endógenos y geográficos. Por su parte, el acoplamiento entre múltiples incompatibilidades endógenas ha sido descrito en varias ocasiones (Barton, 1983; Barton & Hewitt, 1985). También se podría producir el acoplamiento entre factores exógenos y endógenos, si bien este fenómeno no ha sido muy discutido, y el debate se ha centrado principalmente en la importancia relativa de ambas barreras, y no tanto en su interacción (Barton, 2001).

Del mismo modo, este acoplamiento podría estar afectando también a las clinas de infección descritas, y podría explicar la coincidencia entre el descenso en los niveles de infección y la brusca caída de la banda P (marcador citogenético propio de Cpp). Si esto fuese así, la clina correspondiente a este marcador citogenético, así como las clinas de infección, podrían haberse desplazado espacialmente hasta acoplarse, mostrando la actual distribución. A su vez, se ha propuesto que al igual que ocurre en las zonas híbridas de los hospedadores, las zonas híbridas establecidas entre varios tipos de *Wolbachia*, podrían tender a acoplarse con áreas en las que hubiera una menor densidad poblacional debido a barreras geográficas como la que se presenta en los Pirineos (Turelli, 1994). Asistimos pues a un juego de fuerzas, en un sentido y el contrario, cuya resultante es el escenario observable.

#### **32.4 Análisis de la estructuración poblacional.**

El análisis de esta estructuración poblacional se ha planteado desde varios puntos de vista. En primer lugar se ha realizado un análisis de conglomerados jerárquicos con el fin de detectar el número de *clusters* más probable en base a las frecuencias de infección de cada población. En segundo lugar se ha realizado una adaptación del test AMOVA y del test de

Mantel, con el fin de corroborar esta estructuración, y relacionarla con la divergencia por distancia de las poblaciones.

El análisis de conglomerados jerárquicos (Fig. 28) respalda los patrones de infección previamente descritos, si bien propone una mayor subdivisión de las poblaciones. Las poblaciones muestreadas en el norte de Europa, concretamente en Noruega, presentan unas tasas de infección por el supergrupo B de *Wolbachia* cercanas a la fijación, que no se han observado en otras poblaciones europeas. Por otro lado, las poblaciones alemanas presentan tasas de infección por B, y de coinfección, más altas que el resto de poblaciones europeas. La detección de estas altas tasas de infección por B, que apuntan un gradiente norte-sur respecto a esta infección, parecen sugerir una expansión poblacional desde estas regiones “del norte” hacia el sur de Europa. Los datos filogeográficos basados en el análisis del MLST, así como el haber detectado estas mismas cepas en otros ortópteros que comparten hábitat con *C. parallelus*, parecen apoyar una infección reciente, mediada quizás por transmisión horizontal. Sin embargo, si esto es así, algún factor desconocido, incluyendo la competencia con el supergrupo F (en una dinámica de expansión opuesta, sur-norte), factores climáticos, o del propio sistema inmune del hospedador, parecen haber detenido la expansión poblacional de *Wolbachia* B.

En relación al supergrupo F, la población de Mokronog, en Eslovenia, presenta altas frecuencias de infección por F, al igual que las poblaciones de Bubión o Capileira en Granada y recientemente (y confirmado sólo en base al gen *16S rRNA*) en poblaciones del norte de Inglaterra, incluyendo Sheffield. Este patrón de infección por el supergrupo F (que a su vez coincide en el plano molecular con el complejo Cp\_ST11 de la infección) en regiones tan distantes de la distribución del hospedador, sugiere varias hipótesis.

En primer lugar, que este supergrupo F sea ancestral en *C. parallelus* y que estemos observando poblaciones en las que se hubiera conservado una infección por este complejo bacteriano ancestral. Los estudios moleculares a su vez proponen que este supergrupo habría co-divergido con el hospedador, existiendo dos ST distintos, el Cp\_ST11 y el Cp\_ST12 muy relacionados entre sí. Esta divergencia podría relacionarse con el propuesto origen recombinante del Cp\_ST12, detectado en las poblaciones francesas de la zona híbrida (por ejemplo, Gabas) y siendo el Cp\_ST11 la cepa más similar al supergrupo F ancestral. El principal problema de esta hipótesis es explicar cómo llegó la infección por este ST del supergrupo F a las poblaciones inglesas tras las glaciaciones.

Otra hipótesis es que el supergrupo F ancestral divergiera con su hospedador durante las glaciaciones, dando lugar a los complejos europeos e ibéricos, y que la infección por la cepa Cp\_ST11 en Bubión fuera fruto de una infección posterior como consecuencia de migraciones

desde Turquía por el sur del mediterráneo. Sin embargo, los muestreos realizados en el Atlas por parte del grupo de investigación, no detectó la presencia de *C. parallelus* en la zona. A su vez, una posibilidad es que durante la expansión poblacional de *C. parallelus* y la colonización de Inglaterra, la infección prevalente fuera la infección por el supergrupo F propio de los Balcanes. Posteriormente, la expansión de la infección por B, desplazaría la infección por F, y la limitara en las poblaciones del sur, como también pudo hacer en el resto de Europa (y de ahí la baja infección por F en Europa).

Las poblaciones de *C. parallelus* del Sistema Central están relacionadas a nivel mitocondrial tanto con las poblaciones de la cornisa Cantábrica, como con aquellas presentes en el Pirineo (Lunt *et al.*, 1998). Sin embargo, actualmente se encuentran aisladas, formando pequeñas islas de distribución a lo largo del Sistema Central, Gredos y sus estribaciones. Citogenéticamente su cromosoma X no presenta la banda E, característica de las poblaciones de Cpe caracterizadas en el Pirineo, reflejando su divergencia en los últimos miles de años (Bella *et al.*, 2007). La inclusión de estas nuevas poblaciones (Morcuera, Canencia, Navafría, Plat. de Gredos, Hoyos del Espino, Becedas...), permite observar un modelo de infección que se asocia al denominado “Patrón del sur”, y que coincide *grosso modo* con las poblaciones al sur del Pirineo. La principal diferencia es el incremento de los niveles de coinfección frente a poblaciones como Escarrilla, sin que esto suponga nunca llegar a los valores de coinfección de Sallent de Gállego. Por sus características, es posible que exista cierto grado de endogamia (aunque no hay datos que lo corroboren), lo que según Branca *et al.* (2009) podría favorecer niveles altos de infección. Sin embargo, pese a que existen niveles moderados de coinfección en algunas poblaciones, estos no parecen incrementarse a lo largo de los años. La existencia de variación intranual en la infección de estos organismos ha sido propuesta como una posible explicación a estas tasas moderadas de coinfección (ver siguiente sección).

Respecto a las poblaciones de Navarra, País Vasco, Asturias, Galicia, Palencia y León incluidas en el estudio, cabe destacar su similitud respecto a las frecuencias de infección (así como por las características moleculares de las cepas analizadas) con las poblaciones de *C. parallelus* del sur de Francia (“Patrón del norte”). Esto coincide con la mayor introgresión de caracteres de Cpp en poblaciones de Cpe detectado en la cornisa cantábrica, y que se ha explicado debido a la menor altura de las cumbres del Pirineo navarro (Bella *et al.*, 2007).

Tras realizar este análisis se quiso comprobar la validez estadística de la subdivisión en los 6 *clusters* propuestos. Para ello se empleó la propiedad aditiva de los valores de G. Tras la construcción del dendograma, se determinó (i) el valor de la  $G_{total}$ , o valor de G de todas las muestras consideradas independientemente; (ii) la  $G_{pooled}$ , que se corresponde con el valor de G

entre los *clusters*, considerando cada *cluster* como una única población, y (iii) finalmente, la  $G_{heterogeneity}$ , suma de las tres G calculadas dentro de cada grupo (*i.e.*, dentro de los grupos). De este modo se pudo determinar que para un  $K=6$ , se maximiza el porcentaje de la varianza explicada por la división de las muestras en subgrupos, de modo que aproximadamente un 75% de la varianza se explica por la división de las poblaciones en los 6 *clusters*. Este análisis respalda la subdivisión de los patrones de infección.

El estudio se completó mediante la adaptación de dos análisis frecuentemente aplicados a las frecuencias alélicas presentes en distintas poblaciones. Estos test (AMOVA y test de Mantel) no han sido diseñados de forma específica para analizar las diferencias en las frecuencias de infección entre poblaciones, y su utilización en este contexto debe ser contemplada con precaución. Sin embargo, dado que sus resultados respaldaban el resto de datos, se han tenido en consideración.

En el primer caso se probaron varias agrupaciones, acordes con el dendograma previamente construido, observándose valores de  $F_{CT}=0,331$  en el caso de 6 *clusters*, que reflejan la subdivisión propuesta en el dendograma resultante del análisis de conglomerados. Este valor nos indica una importante estructuración espacial y respalda el análisis de conglomerados. A su vez, nos interesaba conocer si esta estructuración podía asociarse a la distancia geográfica entre las poblaciones, esto es, poblaciones más distantes también divergían en mayor medida. Esto pudo analizarse mediante el test de Mantel, que analiza la correlación entre dos matrices: la matriz de distancias genéticas, y la matriz de distancia geográfica. Este índice de correlación tomó un valor de  $r=0,520821$ , con  $p\text{-valor}\approx 0,000$ . Este resultado nos indica que efectivamente las diferencias observadas en las frecuencias de infección están relacionadas con la distancia entre las poblaciones, respaldando la hipótesis de que la infección por *Wolbachia*, está y ha estado relacionada con las expansiones demográficas de su hospedador.

### **33      VARIACIÓN INTRA-GENERACIONAL DE LA INFECCIÓN POR** **WOLBACHIA.**

Con el fin de determinar si la infección de *Wolbachia* en *C. parallelus* es estable a lo largo del ciclo de vida del hospedador, se analizaron las frecuencias de infección a lo largo de tres muestreos intra-anales en dos poblaciones independientes, Navafría (Sistema Central) y Sallent de Gállego (zona híbrida pirenaica). Las frecuencias globales de infección en ambas poblaciones son consistentes con estudios previos (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010), así como con las series anuales referidas en esta tesis doctoral. En este sentido, y como ya se ha indicado, la población



de Navafría presenta una alta infección por el supergrupo F, frente al predominio de la coinfección bacteriana por B y F detectada en la población de Sallent de Gállego.

Se ha propuesto que las altas tasas de coinfección detectadas en Sallent de Gállego sean una consecuencia de una selección positiva a favor de los individuos coinfectados (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Sin embargo, si esta selección actúa igualmente sobre los individuos coinfectados de otras poblaciones, incluido Navafría, ¿por qué no observamos un incremento mantenido de la coinfección en el resto de poblaciones? Como hemos comentado, el caso de Sallent de Gállego parece ser peculiar, y son muchos los factores que pueden estar implicados en la expansión de la coinfección. Por ejemplo, factores demográficos propios de esta población pirenaica. Aunque sin embargo, pueden existir explicaciones alternativas. Las diferencias detectadas hacen necesario discutir las posibles causas por las que la coinfección parece verse frenada por ejemplo en localizaciones descritas en el Sistema Central, donde las frecuencias de coinfección pese haber alcanzado niveles que pueden rondar el 30%, parecen haberse estabilizado, no observándose una tendencia a que sus valores aumenten.

El análisis de las frecuencias intra-anales reveló una reducción en los niveles de coinfección de los machos a lo largo del ciclo de vida del hospedador en la población de Navafría del Sistema Central, en contraste con la población pirenaica de Sallent de Gállego, donde no se observa esa reducción. Estudios previos habían descrito reducciones en los niveles de infección durante el ciclo de vida del hospedador, asociado por ejemplo al envejecimiento (Giordano *et al.*, 1995a; Clark *et al.*, 2002; Brelsfoard & Dobson, 2011), o a la frecuencia de cópulas (Noda *et al.*, 2001a; Kittayapong *et al.*, 2002; McGraw *et al.*, 2002b), sin embargo no se ha analizado el efecto a largo plazo de estos fenómenos.

Numerosos estudios han establecido modelos matemáticos para explicar la evolución de las frecuencias de infección por *Wolbachia* de una generación a otra, basándose en la incompatibilidad citoplasmática, la fecundidad de las hembras y las tasas de transmisión (Turelli, 1994; Frank, 1998; Egas *et al.*, 2002; Vavre *et al.*, 2003; Dobson, 2004; Engelstaedter *et al.*, 2007; Vautrin *et al.*, 2007; Haygood & Turelli, 2009). Sin embargo, generalmente no se han tenido en cuenta aspectos específicos de la biología del hospedador, así como factores ambientales que potencialmente puedan afectar a la expansión de la infección (Breeuwer & Werren, 1993; Giordano *et al.*, 1995b; McGraw *et al.*, 2002b; Kondo *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2007). Por ejemplo, la temperatura (sin descartar otros factores), podría ser un factor relevante en cuanto que *Wolbachia* ha sido descrita como una bacteria termosensible (Rigaud & Juchault, 1998; Hurst *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2003; Bordenstein & Bordenstein, 2011).



Estudios previos apuntan a que la expansión de la coinfección puede verse afectada por la competición entre cepas, así como por condiciones ambientales (Kondo *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2007). Tras detectar la disminución de la coinfección a lo largo del ciclo de vida del hospedador, proponemos que algún elemento, actuando en contra de la coinfección de los machos, podría explicar los niveles estables de coinfección detectados en Navafría y en otras poblaciones ibéricas. Algunos de estos factores serán discutidos a continuación.

### 33.1 Factores genéticos.

Un primer agente a considerar y que pudiera explicar las diferencias observadas entre la población de Navafría y Sallent de Gállego, son las diferencias genéticas entre ambas poblaciones, tanto entre las cepas bacterianas implicadas, como entre los hospedadores.

Ambas poblaciones están infectadas por los supergrupos F y B de *Wolbachia*. El análisis filogenético basado en el gen *16S rRNA*, así como en los genes pertenecientes al MLST de *Wolbachia* y en el gen *wsp*, apoyan que ambas poblaciones están infectadas por cepas bacterianas muy cercanas, e incluso idénticas en algunos casos (ver Fig. A1 y A2 del anexo A, y sección “Variación intra-generacional de la infección por *Wolbachia*”, pág. 237). Debido a ello, no consideramos que estas disparidades sean suficientes como para inducir las diferencias observadas.

Por otro lado, asumimos que ambas poblaciones presentan similitudes desde el punto de vista genético. Navafría es una población pura, perteneciente a la subespecie *C. parallelus erythropus*. Por otro lado, Sallent de Gállego, si bien ha sido considerada como población híbrida, se encuentra en el extremo español de la zona híbrida y sus individuos presentan características que en el pasado fueron consideradas “puras”. De hecho, esta población había sido considerada pura hasta los estudios de Serrano *et al.* (1996). Aun así, ambas poblaciones se encuentran aisladas entre ellas, por lo que su “background” genético será presumiblemente diferente. Sabemos que el genoma del hospedador influye sobre el fenotipo de *Wolbachia* (Clark *et al.*, 2003; Charlat *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2008). Debido a ello, no podemos descartar que este distinto “background” pueda explicar al menos parcialmente las diferencias observadas respecto a los niveles de infección, aunque ante la falta de datos concretos, otras explicaciones no deban descartarse.

### 33.2 Descenso de la coinfección asociada a los machos.

Otro hecho a destacar son las diferencias en las frecuencias de infección observados entre machos y hembras, en el seno de una misma población, a lo largo del ciclo de vida del ortóptero. De este modo, nuestros datos apuntan a que el descenso de la coinfección afecta de forma específica a los machos. Recordemos que el suave descenso observado en las hembras, no era significativo, pese a que los tamaños muestrales fueron similares, aprox.  $n=300$ . En este sentido, cabe destacar el trabajo de Koehncke *et al.* (2009). Dicho estudio analiza la actuación diferencial de la selección en machos y hembras afectados por incompatibilidad citoplasmática. Sus resultados muestran que la selección actúa de forma antagonista en ambos sexos. Mientras que en los machos se ven favorecidos aquellos genes o elementos de regulación génica responsables de reducir el efecto de la incompatibilidad citoplasmática en los cruces incompatibles, en las hembras se ven favorecidos aquellos genes o elementos de regulación que incrementan el efecto de la IC. En todos los casos los autores hablan de mecanismos de regulación específicos de sexo.

Hay que recordar que la ventaja adaptativa que presumiblemente presentan las hembras coinfectadas al poderse aparear con cualquier tipo de macho, independientemente de su tipo de infección, es dependiente de frecuencia. Esto es, si los niveles de coinfección son bajos en la población, tal ventaja no existirá (Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008). Las hembras coinfectadas presentarían una ventaja adaptativa (respecto a otras hembras no infectadas o infectadas por una única cepa) debido a la capacidad de sus ovocitos para *rescatar* todas las posibles *modificaciones* en el esperma de los machos efectuadas por las distintas cepas de *Wolbachia* que infectan la población. Por lo tanto, la selección actuaría incrementando las frecuencias de coinfección paulatinamente, para lo cual se verían favorecidos cualquier gen o regulación de estos que favoreciera la transmisión de ambas cepas. Distintos estudios revelan que el incremento de la transmisión está relacionado con el incremento de la densidad bacteriana, así como con el de los niveles de incompatibilidad citoplasmática (Duron *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2007). Por contra, la disminución de la fertilidad de los machos coinfectados como consecuencia de la incompatibilidad bidireccional, en condiciones en las que las tasas de coinfección son aun bajas, podría actuar como una diana opuesta de selección, favoreciendo aquellos genes y /o la regulación de los mismos, que contribuyan a eliminar o reducir la infección en los machos.

Esta idea ya había sido sugerida por Turelli (1994) y otros autores (Vala *et al.*, 2002; Vavre *et al.*, 2003), refiriéndose a ella como “*Male resistance*”, o “*Male-specific repression*”. En

estos casos se analizaba desde un punto de vista teórico la posibilidad de que alelos que limitaran la intensidad de la IC en los machos pudieran expandirse en la población. Debemos recordar que la disminución de la intensidad de la IC ha sido relacionada con la de la densidad bacteriana (Duron *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2006; Mouton *et al.*, 2007). Ejemplos indirectos de estos procesos se han detectado en *Drosophila* sp., donde sólo los machos jóvenes, con altas densidades bacterianas, son capaces de inducir IC. El descenso de la densidad bacteriana era relacionada en esta ocasión con la senescencia (Clark *et al.*, 2003).

Bajo esta hipótesis, en la población de Navafría con altos niveles de infección por el supergrupo F, los machos coinfectados verían reducido su éxito reproductivo, dado que parte de los cruces serían potencialmente incompatibles. Esto significaría que bajo estas condiciones, cualquier gen o elemento de regulación específico de sexo ("*host-modifiers*") que favoreciera la eliminación de las cepas de *Wolbachia* que causaran incompatibilidad (en nuestro caso, la cepa B por ser la menos frecuente) serían seleccionados positivamente, y su frecuencia se incrementaría en la población. En otras palabras, los machos tenderían a eliminar la cepa que cause incompatibilidad, mientras que en las hembras, la selección incrementaría las tasas de transmisión. La dinámica de la infección sería el resultado de estos intereses contrarios (Koehncke *et al.*, 2009). Los individuos infectados únicamente por la cepa B son relativamente raros en Navafría, por lo que con nuestras técnicas, sería difícil detectar a nivel estadístico una reducción en sus frecuencias de infección. Sin embargo, este efecto podría ser visible en los individuos coinfectados, que eliminarían selectivamente esta cepa a lo largo de su ciclo de vida.

Este fenómeno ha sido observado recientemente en poblaciones de *Aedes albopictus*, donde la densidad bacteriana es dependiente del sexo del hospedador. En este sistema se observa que las hembras siempre están coinfectadas por dos cepas de *Wolbachia* pertenecientes a los supergrupos A y B y cuya densidad bacteriana aumenta a lo largo de la vida del individuo. Sin embargo, la dinámica de la infección en los machos es totalmente opuesta, de tal modo que la cepa A disminuye radicalmente durante el ciclo de vida del individuo llegando incluso a su desaparición (Tortosa *et al.*, 2010). Este patrón coincide con el observado en *C. parallelus*, donde se observa una disminución de la coinfección específica en los machos. Sin embargo, en el caso de *Aedes albopictus*, esta disminución se asoció a la senescencia de los individuos, lo que es poco plausible en *C. parallelus* debido al comportamiento diferencial de las dos poblaciones analizadas.

Por contra, la posibilidad de cruzamientos incompatibles es menor en poblaciones con altos índices de coinfección, como por ejemplo Sallent de Gállego. Bajo estas condiciones, no esperaríamos selección hacia aquellos genes o elementos de regulación específicos de sexo que

redujeran los niveles de incompatibilidad en los machos, por ejemplo mediante una disminución en la densidad bacteriana en los machos. Este fenómeno podría explicar el actual equilibrio observado en ambas poblaciones, así como las diferencias en la dinámica de la infección entre sexos en Navafría y Sallent de Gállego.

### **33.3 Factores ambientales: ¿Podría la temperatura modular la infección por *Wolbachia* en la Península Ibérica?**

En contraste con los posibles factores genéticos bacterianos que influyan en la dinámica de la infección a lo largo del ciclo de vida de *C. parallelus*, proponemos la posible implicación de la temperatura en la variación intra-anual observada en la infección en la población de Navafría. Nuestros resultados muestran diferencias en la dinámica de la infección entre poblaciones cuyas condiciones climáticas difieren, concretamente a nivel de temperatura. Destacar que ambas poblaciones divergen en las temperaturas medias de los meses de julio y agosto, pese a que ambas presentan orientación sur. A su vez, la influencia de la temperatura podría explicar la actual distribución de la infección en otras poblaciones de este ortóptero, incluidas aquellas poblaciones situadas más al sur en la Península Ibérica.

*Wolbachia* ha sido descrita como una bacteria termosensible. De hecho, es habitual inducir choques térmicos de entre 30-37°C a los insectos con el fin de eliminarla (Clancy & Hoffmann, 1998; Van Opijnen & Breeuwer, 1999; Wiwatanaratnabutr & Kittayapong, 2006). Las temperaturas altas pueden interferir en la biología de los insectos en distintos aspectos, afectando a la dinámica de la infección. Varios autores presentaron evidencias de cómo las altas temperaturas disminuían las tasas de transmisión, así como los niveles de incompatibilidad (Clancy & Hoffmann, 1998; Hurst *et al.*, 2001; Anbutsu *et al.*, 2008; Bordenstein & Bordenstein, 2011). Por otro lado, las bajas temperaturas durante la diapausa (<4°C), también pueden emplearse para eliminar *Wolbachia* de los embriones de *Nasonia* sp. (Bordenstein & Werren, 1998; Reynolds *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a que las dos poblaciones caracterizadas para estos fines en el marco de esta tesis doctoral, estarían afectadas por inviernos muy fríos, no esperaríamos tales diferencias asociadas a las bajas temperaturas (Agencia Estatal de Meteorología, 2011).

Queremos resaltar que la frecuencia de la cepa B en la zona central de la Península Ibérica es menor que en otras poblaciones europeas. Así mismo, los individuos infectados por el supergrupo B son extremadamente raros o inexistentes en las poblaciones de Bubión (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010) y Capileira, en el sur de la Península (Sarasa, 2013). Por otro lado, este

patrón se repite en la población de Mokronog (Eslovenia), donde los individuos infectados por el supergrupo B son extremadamente raros (dentro del rango de error de la técnica de detección). Las temperaturas medias de estas poblaciones durante el verano, son en general más altas que en otras poblaciones europeas (comprobado en (<http://meteo.arso.gov.si/met>) y en Agencia estatal de Meteorología. Esta coincidencia sugiere que la temperatura pudiese modular el patrón geográfico de la infección.

No podemos descartar la posibilidad de que existan distintas susceptibilidades a la temperatura entre cepas bacterianas. Gran parte de los estudios sobre la influencia de la temperatura en *Wolbachia* han sido realizados en cepas pertenecientes a los supergrupos A o B (Breeuwer & Werren, 1993; Hurst *et al.*, 2001; Bordenstein & Bordenstein, 2011) y, hasta donde sabemos, no hay estudios similares que afecten al supergrupo F. Si las cepas B y F tuvieran un comportamiento diferencial con respecto a este componente climático, esto podría explicar la recurrencia de la infección por la cepa B en las poblaciones europeas, frente a sus bajas tasas en otras poblaciones ibéricas, así como en la población de Mokronog, más cálida.

La temperatura puede afectar también a *Wolbachia* indirectamente. Por ejemplo, las altas temperaturas están relacionadas con un incremento en las densidades del fago WO, quien a su vez condiciona una disminución de la densidad bacteriana (Bordenstein & Bordenstein, 2011). Los datos disponibles acerca de la infección por el fago WO en las cepas de *Wolbachia* descritas en *C. parallelus* es aun limitada y fruto de la colaboración con el Prof. Seth Bordenstein (Vanderbilt University, Tennessee, USA). Sabemos que este fago infecta tanto a los supergrupos B como F de esta bacteria. Este último dato es de especial interés dado que anteriormente no se había descrito en este supergrupo de *Wolbachia*. Hasta el momento se han descrito 5 grupos de secuencias pertenecientes a este fago, uno de ellos, denominado “grupo 5” descrito únicamente en individuos de *C. parallelus* infectados por el supergrupo F (S. Bordenstein, com. pers.). Sin embargo, desconocemos si este bacteriófago se expresa de alguna manera en las cepas bacterianas descritas en *C. parallelus*, y si ello podría tener alguna implicación en este estudio.

Por otro lado, en el caso concreto de *C. parallelus*, existe una estrecha conexión entre la respuesta inmune y la temperatura ambiental que debe ser comentada. El sistema inmune de *C. parallelus*, así como el de gran parte de los acrídidos estudiados (Ouedraogo *et al.*, 2003; Springate & Thomas, 2005) se ve modificado en función de la temperatura ambiental. Por ejemplo, los insectos cambian la orientación de su cuerpo en relación a radiación solar o la dirección del viento con el fin de ajustar su temperatura corporal. Esta modificación de su comportamiento ha sido asociada con la susceptibilidad a algunos patógenos, y ha sido interpretado como un mecanismo de defensa contra hongos y bacterias (Thomas & Blanford,

2003). Por ejemplo, Inglis *et al.* (1999) mostraron que las altas temperaturas reducían la mortalidad de individuos de *Melanoplus sanguinipes* (Acrididae) cuando eran expuestos a distintos patógenos.

Sugerimos que el efecto de la temperatura en la bacteria, o en la respuesta inmune del hospedador, podría afectar a la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus* en condiciones naturales. De este modo, una respuesta diferencial del sistema inmune podía afectar a la infección por *Wolbachia*, disminuyendo la eficiencia de la bacteria, tal como ocurre con otros endosimbiontes (Anbutsu, 2008). A su vez, los genes del sistema inmune son una diana para la actuación de la selección (“*the large immune effect*”), en lo que se ha denominado *evolución mediada por simbiosis* (Brucker & Bordenstein, 2012b). Por esta razón, los genes del sistema inmune podrían ser buenos candidatos para sufrir modificaciones como consecuencia de la presión selectiva de los endosimbiontes (“*host-modifiers*”) y podrían explicar la pérdida selectiva de determinadas variantes de *Wolbachia*, en nuestro caso el supergrupo B en los machos (ver arriba) (Tortosa *et al.*, 2010).

Para comprobar si la disminución de la coinfección efectivamente está inducida por las condiciones cálidas, sería necesario contrastar este patrón de infección en otras poblaciones de la cuenca mediterránea, incluidas poblaciones del centro y sur de Italia, así como de los Balcanes y Turquía, y corroborar este patrón de infección en otros modelos experimentales.

El efecto potencial de la temperatura, directo o indirecto, a su vez puede ser de gran interés en programas de biocontrol basados en la infección mediante endosimbiontes, así como en otros estudios aplicados. Pequeños cambios en la temperatura podrían alterar la susceptibilidad de los insectos a estos agentes de biocontrol. Varios ejemplos de este tipo de efectos pueden consultarse en sistemas de resistencia a distintos patógenos testados en acrididos, como por ejemplo resistencia a hongos microsporidios, bacterias como Rickettsiales y virus (Adamo, 1998; Frid & Myers, 2002; Olsen & Hoy, 2002). Debido a las repercusiones de este tipo de interacciones en condiciones naturales, recalamos la importancia de completar los estudios de laboratorio con estudios de campo (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Raghavendra *et al.*, 2011).

Esta hipótesis no concuerda aparentemente con la aparición de la cepa F en el norte de Inglaterra. Estos individuos solo han sido caracterizados a nivel del gen *16S rRNA*, y por tanto no sabemos aun si pertenecen a la misma cepa que aquellas presentes en Eslovenia o Bubián.

### 33.4 Simulaciones matemáticas



Existen múltiples modelos matemáticos desarrollados con el fin de explicar la dinámica de expansión de la infección por *Wolbachia*. Sin embargo, ninguno de ellos considera las fluctuaciones intra generacionales de la infección (Turelli, 1994; Telschow *et al.*, 2002b; a; Telschow *et al.*, 2006; Telschow *et al.*, 2007; Vautrin *et al.*, 2007; Vautrin *et al.*, 2008).

Nuestros resultados apoyan que las frecuencias de infección por *Wolbachia* pueden variar a lo largo del ciclo de vida de *C. parallelus*. Por tanto, nos preguntamos si este efecto podría tener repercusiones en la dinámica de la infección a largo plazo. A su vez, nos planteamos si este suceso, detectado en la población de Navafría, podría estar relacionado con la actual distribución de la infección en *C. parallelus*. Esto es, si la reducción en los niveles de coinfección en los machos a lo largo de su ciclo de vida, está relacionado con el patrón de infección característico de las poblaciones del centro y sur peninsular, al igual que la infección detectada en Eslovenia.

Para ello, se desarrollaron varios modelos que caracterizan la dinámica de la infección a largo plazo (4.000 generaciones). Previamente, y como primera aproximación, se implementó un modelo más simple, que únicamente contemplaba la infección por una cepa. A continuación, los cálculos conjugaron dos factores, en primer lugar la intensidad de la incompatibilidad citoplasmática (con dos variantes: modelo restrictivo y modelo relajado), y en segundo lugar, la disminución de la coinfección en los machos para ambos escenarios. Como resultado, obtuvimos 4 posibles escenarios futuros que serán discutidos a continuación.

#### 33.4.1 Progresión de la infección por una única cepa.

Nuestras simulaciones para la progresión de la infección por una única cepa de *Wolbachia*, muestran la existencia de un umbral en las frecuencias de infección bajo el cual la expansión de la infección no es posible. Este efecto ya había sido descrito por Turelli (1994). Sin embargo, hemos observado que este umbral sólo existe en las hembras, lo cual podría de nuevo estar relacionado con el papel diferencial de ambos sexos en relación a la infección por este endosimbionte. Las simulaciones muestran que se requiere una alta transmisión (expresada como  $\mu < 0,10$ )  $\mu < 0.1$  para mantener la infección de una cepa cuyo valor de incompatibilidad citoplasmática fuese próxima a las estimas realizadas en *C. parallelus* por Bella *et al.* (2010) y por M. Zabal-Aguirre (com. pers.) en el marco de sus tesis doctoral ( $H_{UNI}=0,67$ )  $H_{UNI} = 0.67$ . Si el valor de H se incrementa (menor incompatibilidad) será necesaria una tasa de transmisión más alta ( $\mu < 0,1$ ) para compensar esta reducción en la incompatibilidad.



Las simulaciones muestran que se requeriría un mínimo de 60% de individuos infectados para que la infección fuese estable bajo estas condiciones (ver Fig. 32). Este escenario es consistente con las tasas de infección detectadas en algunas poblaciones de *C. parallelus* infectadas (mayoritariamente) por una única cepa, como por ejemplo Bubión en Sierra Nevada. Sin embargo, difiere de los datos experimentales obtenidos de numerosas poblaciones europeas, donde las frecuencias de infección por la cepa B, son mucho menores y se mantienen estables a lo largo de los años muestreados. Esta discrepancia podría explicarse en el caso de que la infección en estas poblaciones fuese reciente, y no se hubiese alcanzado el equilibrio. Por otro lado, existen condicionantes ambientales que podrían influir en esta dinámica. Este caso, en el cual se detecte una única cepa de *Wolbachia* infectando a *C. parallelus* es raro, y el modelo, requiere la inclusión de una segunda cepa para ajustarse a la realidad experimental observada.

#### **33.4.2 Progresión de la infección por dos cepas de *Wolbachia*: Efecto del descenso de las frecuencias de la coinfección en la dinámica de *Wolbachia*.**

Las simulaciones realizadas incluyeron dos modelos distintos con el fin de estudiar la dinámica a largo plazo de la infección. En ambos casos, los datos de partida fueron una población, cuyas frecuencias de infección iniciales fuesen equivalentes a las detectadas en Navafría en esta parte del estudio, con el fin de valorar la evolución de las frecuencias de infección en esta población a largo plazo y comprobar si la reducción en las frecuencias de coinfección observadas tienen algún efecto en su progresión.

Ambos modelos difieren en la matriz  $M_{ci}$ , que refleja el efecto paterno de la infección (Vautrin *et al.*, 2007). A su vez, hemos incluido la variación intrageneracional observada, con el fin de comprobar si este fenómeno, descrito en el marco de esta tesis doctoral, influye en la progresión de la infección. Finalmente estamos interesados en conocer qué modelo explicaría mejor los datos empíricos relacionados con la biogeografía de esta bacteria.

##### *Modelo restrictivo: con y sin variación intrageneracional.*

El denominado modelo restrictivo asume que una cepa de *Wolbachia* no puede rescatar las modificaciones en la cromatina del macho realizadas previamente por otra cepa, siguiendo la nomenclatura del modelo de *modificación-recate* (Serbus *et al.*, 2008). Las simulaciones muestran un rango restrictivo de parámetros bajo los cuales la cepa F podría progresar en una población equivalente a Navafría. Fuera de estos parámetros, la coinfección se convertiría



progresivamente en predominante, o bien, desaparecería. Estos resultados no reflejan lo observado en la Península Ibérica, donde la infección por el supergrupo F es predominante. Por ello nos planteamos si incorporar la variación intrageneracional podría afectar a estas predicciones. Para ello se incluyó una reducción recurrente de la coinfección de los machos, en los términos en los que fue observada en el campo.

Las simulaciones mostraron que, efectivamente, las variaciones en las frecuencias de coinfección inciden en los resultados finales. Esto demostraba que este fenómeno sí podía condicionar la dinámica de la infección. Se observó que el rango de parámetros bajo los cuales esperaríamos una progresión de la cepa F se ampliaba. Así se conseguía una mayor aproximación experimental al patrón observado, lo que nos lleva a proponer a el modelo incluyendo variación intrageneracional parece más palusible, frente al modelo restrictivo sin incorporar dicha variación, con las implicaciones que esto puede tener para otros sistemas y organismos que cumplan estas condiciones.

#### *Modelo relajado, con y sin variación intra-generacional.*

Sin considerar otros factores, el modelo relajado parece ajustarse mejor que los dos anteriores a los datos experimentales. Este modelo alternativo considera que existe un rescate parcial entre cepas, un caso más cercano a lo que aparentemente sucede en *C. parallelus* (Zabal-Aguirre, com. pers.). En este caso, una incompatibilidad suave, (expresada a modo de  $H_{BI} > H_{UNI}$ ) entre cepas distintas, tiene un efecto negativo en la capacidad de invasión y en el mantenimiento de la coinfección, cuyo umbral de infección aumenta. Según crece el valor de H (descenso de la incompatibilidad), la ventaja de las hembras coinfectadas disminuye, por lo que no esperaríamos observar un incremento de los individuos coinfectados. Sin embargo, este mecanismo favorecerá el aumento de la cepa prevalente en la población, en nuestro caso, la F.

A su vez, la incorporación a este modelo relajado de la variación intrageneracional, incrementa enormemente el rango de parámetros bajo los cuales se puede alcanzar una prevalencia, mantenida en el tiempo, de la cepa F (comparar Fig. 33a-d). Este rango incluye los valores de  $H=0,67$  descritos previamente por Zabal-Aguirre (com. pers.) y Bella *et al.*, 2010.

Estas simulaciones confirman que un descenso en los niveles de coinfección en los machos puede actuar como barrera en la expansión de la infección, independientemente de los factores que lo cause. Este hecho favorece el mantenimiento de la infección prevalente en un primer momento y promueve su mantenimiento, fenómeno que es mayor cuando las simulaciones incluyen la variación intrageneracional combinada con el modelo relajado.

Los datos filogeográficos de los que disponemos apoyarían una infección ancestral en la Península Ibérica por la cepa F de *C. parallelus*, y la posterior expansión desde el norte de la cepa B (ver sección “Filogenia y filogeografía de *Wolbachia*”, pág. 138, así como las figuras A1 y A2 del anexo A). A su vez, los datos de las simulaciones apoyarían que algún factor capaz de producir una disminución recurrente de la coinfección en los machos (¿quizás la temperatura?), dificultaría la expansión de esta cepa B en una población previamente infectada por la cepa F, y podría explicar la actual distribución de la cepa B en la Península Ibérica.

## **34 FILOGENIA Y FILOGEOGRAFÍA DE *WOLBACHIA*.**

### **34.1 Caracterización de las cepas de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus* en base al gen *16S rRNA*.**

El gen *16S rRNA* está muy conservado debido a sus propiedades estructurales y su función esencial en la célula (ver revisión en Clarridge, 2004). La selección de este gen para el análisis filogenético de especies bacterianas tiene su origen en los estudios realizados por Dubnau *et al.* (1965) en donde se observó su conservación entre cepas de *Bacillus* spp. A su vez, Woese *et al.*, (1985) recogieron las ventajas de este marcador molecular. Entre ellas (y además del alto grado de similitud entre especies lejanas), se encuentra la existencia de regiones extremadamente conservadas, con la posibilidad de utilizar por ello *primers* universales; una longitud de la secuencia a analizar adecuada, de unos 1500 pb, y el alto número de secuencias ya caracterizadas (incluso en ese momento) en las bases de datos. De este modo, los estudios filogenéticos para este gen permiten determinar a nivel de género cualquier especie bacteriana, e incluso relacionar todas las formas de vida debido a su homología con el gen *16S rRNA* detectado en Arqueas, y el gen *18S rRNA* eucariota.

Pese a sus múltiples ventajas, el principal problema de la utilización de este gen para establecer la filogenia de *Wolbachia* es precisamente su alto grado de conservación. Esto hace que, pese a que en ocasiones permite una buena resolución incluso entre bacterias de una misma localización geográfica, no sea un marcador muy adecuado para realizar estudios dentro de un mismo género bacteriano (Clarridge, 2004). De ahí la necesidad de emplear otros marcadores que permitan caracterizar con mayor precisión las distintas cepas bacterianas detectadas infectando a esta especie de ortópteros.



Pese a ello, el análisis filogenético de las variantes para el gen *16S rRNA* de las cepas de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus* confirman con un soporte sólido su pertenencia a los supergrupos B y F, tal como proponen Zabal-Aguirre *et al.* (2010).

La topología obtenida por Inferencia Bayesiana incluyó las secuencias descritas en *C. parallelus*, así como otras disponibles en las bases de datos, pertenecientes a los supergrupos B y F respectivamente (Fig. 35). Los valores de las probabilidades posteriores muestran una topología robusta, consistente con Lo *et al.* (2002).

Estudios previos han inferido las relaciones filogenéticas entre supergrupos sin asignar una raíz (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). En este se ha enraizado el árbol, utilizando para ello el gen *16S rRNA* del grupo externo *Rickettsia sp.*, perteneciente también a la familia Rickettsiae, con el fin de ver las relaciones filogenéticas entre los distintos supergrupos descritos para *Wolbachia* (Fig. 35). Sin embargo, la topología obtenida no permite establecer un clado basal claro.

Tal y como se había descrito en la literatura previamente (Casiraghi *et al.*, 2005), determinar la raíz del género *Wolbachia* es problemático: Estos autores intentaron determinar el clado basal utilizando como grupo externo dos especies bacterianas: *Anaplasma marginale* y *Ehrlichia ruminantium*, sin obtener resultados claros. En este caso, el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas conocidas de *Wolbachia* se basó en la concatenación de los genes *ftsZ*, *gtlA* y *groEL*. Se seleccionaron estos genes gracias al conocimiento previo de las secuencias de estos *loci* en las especies bacterianas empleadas como *outgroup*. Los estudios comparativos de distintas topologías usando el test *Shimodaira-Hasegawa* (Shimodaira & Hasegawa, 1999) sugerían distintas raíces, y demuestran que no existe soporte estadístico para determinar la raíz de este género. Lo *et al.* (2002) sugieren como posible causa de este problema la alta divergencia existente entre los posibles géneros empleados como grupos externos, y el género *Wolbachia*.

En ausencia de una raíz bien soportada para el género, el hospedador original de esta bacteria (artrópodos o nematodos) y el origen de la interacción entre hospedador y bacteria (parásita en insectos o simbiótica en nematodos), permanecen sin resolver.

En cuanto a la exclusión en nuestro caso de la especie *Cimex lectularius* (Heteroptera) en el set de datos empleados para la inferencia filogenética del género *Wolbachia*, la alteración que su inclusión causaba debido al efecto de atracción de ramas largas, justifica la decisión de no incluirla en el análisis. Nótese que la utilización de esta especie modificaba la topología del árbol, situándola junto con el grupo externo *Rickettsia*, en lugar de posicionarse junto con los miembros del supergrupo F al que pertenece, según otros estudios (Rasgon & Scott, 2004; Sakamoto & Rasgon, 2006).

Cabe destacar la descripción de una nueva familia de insectos (*Acrididae*, con la especie *Chorthippus parallelus*) como hospedadores del supergrupo F. Esto tiene especial relevancia, dado que este supergrupo ha sido descrito como el responsable de la infección en especies tanto de insectos (*Kaloterms flavicollis*, *Odontotermes* spp. y *Chorthippus parallelus*), como de nematodos (*Mansonella* spp.) (Lo *et al.*, 2002; Bordenstein & Rosengaus, 2005; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). De ahí las implicaciones que este supergrupo tiene en el estudio de las relaciones de asociación entre la infección en insectos y nematodos, y posibles fenómenos de transmisión horizontal.

### 34.2 Filogenia del género *Wolbachia* basada en los genes del MLST.

Las filogenias obtenidas basadas en un único gen son robustas (ver Fig. 38 y Fig. 39 , así como las figuras A3-A17 del anexo A) permitiendo caracterizar los alelos detectados y adscribirlos, bien al supergrupo B, bien al supergrupo F de esta bacteria. En este sentido apoyan la filogenia basada en el gen *16s rRNA*, discutida previamente. Para gran parte de los casos, las topologías de todos los genes fueron congruentes, indistintamente de su resolución por ML o IB.

Sin embargo se han detectado en varios individuos cepas bacterianas cuya adscripción a un determinado supergrupo no puede ser resuelta. En estos casos, se ha observado que una misma cepa, identificada en un determinado individuo, se adscribe al supergrupo F o B dependiendo del gen considerado. Este hecho ha sido interpretado como la consecuencia de eventos de recombinación entre cepas bacterianas pertenecientes a ambos supergrupos. El análisis filogenético detallado de estos casos será discutido más adelante.

En los distintos árboles, pueden distinguirse correctamente los supergrupos A, B, D y F, siendo los resultados en general concordantes con estudios previos (Bordenstein & Rosengaus, 2005; Baldo *et al.*, 2006b; Bordenstein & Werren, 2007). Por otro lado, la convergencia entre cálculos, se analizó mediante estudios paralelos para cada set de datos.

El sistema de clasificación MLST no propone ningún género externo para determinar la raíz del árbol generado a partir de la concatenación de estos genes (Baldo *et al.*, 2006b). Debido a la dificultad de encontrar un grupo externo adecuado que permita resolver la raíz del género, los árboles expuestos son sin raíz.

En relación al supergrupo F, en general se observa para todos los *loci* un mínimo de dos alelos pertenecientes a este supergrupo. La distribución de estos alelos en las poblaciones muestra que aparentemente existe una cepa exclusiva de la región central de la Península Ibérica y el sur de los Pirineos, y otra cepa, que infecta al resto de poblaciones europeas. Esta



distribución geográfica es una constante en los distintos *loci* analizados. En el caso de haberse encontrado un mayor número de alelos, estas variantes “nuevas” han sido detectadas de forma preferencial en las poblaciones híbridas del Pirineo y, de forma puntual, en el País Vasco y Navarra. Estos alelos, aparecen de forma específica en estas poblaciones híbridas desde el punto de vista del hospedador. Su descripción recurrente en ellas nos hace sugerir la relación entre ambos hechos, algo a lo que volveremos más adelante, dada su importancia en términos de coevolución de endosimbionte y hospedador.

En el caso del supergrupo B, la distribución de las cepas detectadas no es tan clara. En general los alelos caracterizados para los distintos *loci* en la Península y el resto de Europa son muy similares, en incluso idénticos, si bien en las poblaciones pirenaicas se han caracterizado alelos nuevos específicos de la zona híbrida. De hecho estos alelos son mayoritarios en las poblaciones híbridas del hospedador.

Por otro lado, los árboles obtenidos a partir de los genes concatenados (Fig. 48 y Fig. 49) son consistentes con los árboles correspondientes a los genes individuales. Se distinguen ambos supergrupos bacterianos. En este caso, existen 4 cepas adscritas al supergrupo F (consideradas parentales tras los estudios de recombinación realizados, ver siguiente apartado), y 10 cepas asignadas al supergrupo B.

Sin embargo, pese a la existencia de un mayor número de cepas pertenecientes al supergrupo B, éstas son muy similares entre sí, lo que indica una divergencia reciente. Por contra las cepas F detectadas en el centro de la Península Ibérica, así como en poblaciones del sur del Pirineo, difieren considerablemente de aquellas detectadas en otras poblaciones europeas.

Hay que recordar que en este caso se han excluido del análisis las cepas bacterianas caracterizadas como recombinantes, debido a las alteraciones que su inclusión induciría en la topología del árbol (Posada *et al.*, 2002).

### **34.3 Recombinación entre cepas bacterianas.**

La recombinación entre cepas de *Wolbachia* ha sido descrita en la bibliografía en distintas ocasiones (Jiggins *et al.*, 2001; Werren & Bartos, 2001; Jiggins, 2002; Reuter & Keller, 2003; Baldo *et al.*, 2005; Verne *et al.*, 2007; Klasson *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2011).

La comparación de secuencias de genes únicos en múltiples cepas bacterianas, demuestra que la recombinación y la transferencia horizontal de profagos y elementos móviles es frecuente en este género bacteriano (Masui *et al.*, 2000; Bordenstein & Wernegreen, 2004;

Gavotte *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2006a; Baldo *et al.*, 2006b; Paraskevopoulos *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2008; Cordaux *et al.*, 2008). A su vez, se ha demostrado que determinados elementos móviles y secuencias repetidas son *hot spots* para la recombinación (Klasson *et al.*, 2009). Por otro lado, estos mismos autores estimaron los niveles de recombinación para *Wolbachia*, siendo sus estimas mayores que las realizadas tras la secuenciación de, por ejemplo, el genoma de *Neisseria meningitidis*, considerada una bacteria con una alta capacidad de recombinación (Jolley *et al.*, 2005). A su vez, la recombinación en *Wolbachia* fue 2 veces superior a *Rickettsia*, género bacteriano relativamente próximo.

La existencia de recombinación supone un problema técnico relevante a la hora de caracterizar las cepas bacterianas que infectan a un determinado hospedador, pero biológicamente, este proceso de recombinación permite la evolución rápida de las cepas, lo que puede ser importante en su interacción con el hospedador.

La recombinación entre cepas altera la correlación entre la historia evolutiva de los genes, la historia evolutiva del genoma completo, y su relación con un determinado fenotipo expresado en su hospedador. Este problema fue detectado en el gen *wsp*, inicialmente empleado para caracterizar a las cepas bacterianas, por lo que se sugirieron sistemas alternativos de clasificación basados en genes *housekeeping*, por ejemplo el MLST. Sin embargo estos tampoco están exentos de sufrir recombinación, como queda revelado por nuestros datos experimentales, con distintos genes y asociaciones de genes soportando diferencias en las relaciones evolutivas entre cepas. Este problema ha sido puntualizado por otros estudios al menos en el supergrupo A (Klasson *et al.*, 2009), sugiriéndose que la población global de *Wolbachia* pueda dividirse en distintas subpoblaciones, cuyas fronteras sean geográficas o asociadas con su especificidad a un determinado hospedador, limitándose la clásica subdivisión en supergrupos.

Estos autores (Klasson *et al.*, 2009) proponen que la recombinación entre cepas sea menos frecuente dentro de las subpoblaciones, y más frecuente entre subpoblaciones. De este modo, aquellas cepas adaptadas a un hospedador concreto, tendrían niveles de recombinación limitadas, frente a aquellas cepas que sobrepasaran el límite de la subpoblación, por ejemplo, entrando en contacto con otro hospedador y que tendrían mayores tasas de recombinación. Esta última propuesta puede ser interesante en el caso concreto de la zona híbrida, en la cual los eventos de recombinación se asocian a las poblaciones híbridas, en las que los genomas de *C. parallelus parallelus* y *C. parallelus erythropus* se encuentran e hibridan, por lo que las distintas cepas de *Wolbachia* que han coevolucionado durante miles de años con su hospedador entran en contacto con un nuevo genoma (híbrido).

#### 34.4 Aparición de alelos raros en las poblaciones híbridas.

Si se analiza esta información en su conjunto, utilizando la metodología propuesta por Baldo *et al.* (2006b), a su vez puede observarse que en la zona híbrida predominan las cepas o STs que han sido consideradas como recombinantes. Estas cepas bacterianas, presentaban simultáneamente alelos adscritos a los supergrupos F y B. Además, se podía observar que estas cepas recombinantes presentaban un gran número de los considerados como “alelos raros”, y que no se habían detectado en poblaciones puras del hospedador.

La aparición de alelos raros, definidos estos como alelos muy poco frecuentes o bien inexistentes en los parentales, y que aparecen de forma específicas en los híbridos (Barton *et al.*, 1983; Schilthuizen & Gittenberger, 1994), es un hecho observado en numerosos sistemas biológicos. De hecho Barton y Hewitt (1985) discutieron 23 casos de zonas híbridas, 19 de las cuales presentaban este fenómeno. No es ajeno a este fenómeno el ortóptero *C. parallelus*, con la aparición de la banda heterocromática H del cromosoma X, asociada a la zona híbrida pirenaica (Serrano *et al.*, 1996; Bella *et al.*, 2007).

Tras la descripción detallada de este fenómeno surgieron varias hipótesis para explicar la generación de estas nuevas variantes asociadas de forma específica a las zonas híbridas. Se postuló la posibilidad de que fueran generadas bien por un incremento de las tasas de mutación, bien por recombinación entre las formas parentales (Woodruff, 1989). Ambas posibilidades fueron descartadas por Bradley *et al.* (1993), Hoffmann & Brown (1995) y Schilthuizen *et al.* (2001), postulando que la mutación era el proceso por el cual se generaban estas nuevas variantes, pero que no existía una tasa acelerada de mutación. Estudios más recientes han comprobado que la aparición de alelos raros afecta a múltiples *loci*, incluidos intrones (Schilthuizen *et al.*, 1999), espaciadores del ARN ribosómico (Liao *et al.*, 2010), microsatélites (Lexer *et al.*, 2006) y SNPs anónimos (Lammers *et al.*, 2013), descartando a su vez las hipótesis previas.

También era necesario explicar porqué una vez que se generaban estas variantes, incrementaban su frecuencia en las poblaciones híbridas. Una de las hipótesis proponía que en una zona de tensión, donde el *fitness* de los híbridos era menor que el de los parentales, cualquier alelo nuevo que redujese esta desventaja podría verse seleccionado, aumentando así su frecuencia (Sanderson, 1989). El principal problema de esta hipótesis era explicar que si estos alelos “nuevos” suponían una ventaja adaptativa, por qué se restringían a la zona híbrida, y no se expandían a otras poblaciones.

Otra idea interesante, y quizás más polémica, es que la selección sobre estos *loci* (o sobre *loci* cercanos que permitieran que alelos neutros incrementaran su frecuencia mediante *hitch-hiking*), implique selección en contra de los mecanismos de aislamiento post-cigótico que se manifiestan en la reducción del *fitness* de los individuos híbridos. Esto es, el incremento de la frecuencia de estos nuevos alelos que mejoran el *fitness*, podría diluir en parte la severidad de la reducción del *fitness* en los híbridos debida a otras fuerzas selectivas, o sobre otros *loci* (Schilthuizen & Lammers, 2013).

A su vez, esta hipótesis está muy relacionada con el concepto de “especiación por hibridación”, que ha atraído gran polémica en los últimos años (Abbott *et al.*, 2013), dado que implicaría la aparición de nuevos alelos de forma específica en una zona híbrida, y por tanto su diferenciación de ambas poblaciones parentales. Sin embargo nuestro caso es peculiar, dado que se trata de la aparición de alelos raros en un endosimbionte asociado a un hospedador híbrido, y no directamente en el genoma del hospedador, en el que a su vez han sido detectados alelos raros (Serrano *et al.*, 1996; Bella *et al.*, 2007).

La relación entre ambos genomas, endosimbionte y hospedador, tras una larga coevolución, es compleja y desconocida. De hecho, en otros sistemas, se han descrito integraciones del genoma de *Wolbachia* en el hospedador (Nikoh *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2010c), y a su vez, cambios en el genoma del hospedador en respuesta a la infección por este endosimbionte (Charlat *et al.*, 2007). No sabemos hasta qué punto los procesos implicados en la aparición de alelos raros en el genoma del hospedador pueden influir y explicar el motivo por el cual aparecen estos nuevos alelos bacterianos, de forma específica en la zona híbrida.

Es posible que estas nuevas cepas bacterianas o STs, fruto de procesos de recombinación entre cepas de los supergrupos F y B, y su posterior diversificación mediante mutaciones puntuales, permitiesen limitar la incompatibilidad existente entre individuos infectados por distintos supergrupos en las poblaciones híbridas, favoreciendo la aparición de nuevas variantes bacterianas. Este hecho podría estar relacionado con que los valores de HBI estimados en la población de Portalet (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010) sean menores que los descritos en otros sistemas.

### **34.5 Caracterización de los complejos ST detectados y su relación con los patrones de infección.**

La caracterización de los distintos alelos correspondientes a los *loci* analizados en el MLST de este género bacteriano, han permitido una descripción detallada de la diversidad



bacteriana presente en las distintas poblaciones analizadas de *C. parallelus* (ver de Fig. 50 a Fig. 56).

En nuestro caso, las ST detectadas pertenecientes al supergrupo F no habían sido descritas con anterioridad. Sin embargo, la escasez de hospedadores cuya infección por el supergrupo F de *Wolbachia* haya sido caracterizada mediante MLST dificulta la identificación de cepas próximas en otros organismos. La máxima similitud se observa para cepas que infectan escorpiones del género *Opisthophthalmus* (Baldo *et al.*, 2007) y cuyo hábitat se encuentra en el norte de África.

En el caso del supergrupo B, se ha detectado una alta similitud con otras secuencias previamente descritas en numerosos organismos, incluidos coleópteros, lepidópteros, himenópteros, hemípteros... Esta similitud no es completa (identidad), por lo que podríamos considerar la detección de un nuevo ST.

Debido a que el supergrupo B ha sido ampliamente estudiado en relación a procesos de transmisión horizontal (Raychoudhury *et al.*, 2009), la alta similitud entre cepas presentes en distintos organismos podría ser relevante a la hora de entender el origen de la infección por este supergrupo en *C. parallelus*, como discutiremos más tarde.

#### **34.6 Problemas asociados a la reconstrucción filogenética en bacterias: construcción de genealogías.**

Las bacterias se reproducen clonalmente y la evolución de sus genomas incluye múltiples procesos: mutaciones puntuales, reorganización genómica, deleciones, duplicaciones, transposición, recombinación y transferencia horizontal de genes (Lawrence & Hendrickson, 2005; Didelot & Maiden, 2010; Wiedenbeck & Cohan, 2011). Los mecanismos mencionados pueden suponer un problema a la hora de determinar las relaciones clonales entre bacterias, dado que la mayoría de los métodos de inferencia desarrollados asumen, por ejemplo, la ausencia de procesos de recombinación (Posada *et al.*, 2002; Drummond *et al.*, 2005).

Debido a las altas tasas de recombinación detectadas en el genoma de *Wolbachia* (Masui *et al.*, 2000; Bordenstein & Wernegreen, 2004; Gavotte *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2006a; Baldo *et al.*, 2006b; Paraskevopoulos *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2008; Cordaux *et al.*, 2008) y corroboradas por nuestros resultados, los estudios previos cuyo objetivo fuera la reconstrucción de la historia clonal de *Wolbachia* basada en un único gen, así como las conclusiones evolutivas y de especialización obtenidas "a priori" sobre esta bacteria, deben revisarse. Con este objetivo, el MLST propuesto por Baldo *et al.* (2006b) se plantea como una

herramienta más adecuada para estos fines (Russell *et al.*, 2009b) permitiendo incluir las secuencias obtenidas en los supergrupo F y B con mayor soporte.

Debido a las elevadas tasas de recombinación descritas, se ha decidido complementar el análisis filogenético, necesario para valorar la filogenia de cada uno de los loci de forma independiente, con el “*Análisis Bayesiano de Genealogías*” mediado por el software *ClonalFrame* (Didelot & Falush, 2007). Esta aproximación estadística para inferir las relaciones clonales entre cepas bacterianas, se basa en la comparación de secuencias de ADN (sistemas multilocus o incluso genomas completos), considerando tanto la ocurrencia de fenómenos de mutación puntual, como de recombinación entre cepas, asumiendo el modelo neutro de coalescencia (Kingman, 1982b).

Destacar que la reconstrucción de las genealogías de las cepas de *Wolbachia* inferida mediante este análisis (Fig. 64 y Fig. 65), muestra un incremento en los eventos de recombinación asociados a las cepas asignadas previamente como STs recombinantes, gran parte de ellas detectadas en las poblaciones híbridas de Tourmont, Portalet y Corral de Mulas. Su origen se debería a distintos sucesos de recombinación y mutaciones puntuales. Hecho que contrasta con otras poblaciones, donde si bien existen frecuencias importantes de coinfección, no se han detectado estos procesos de recombinación.

Esta situación, sin duda controvertida, podría explicarse por múltiples motivos, por ejemplo como consecuencia de la ruptura de los complejos coevolutivos entre las cepas de *Wolbachia* características de cada subespecie, y dicha subespecie. Esta disrupción en poblaciones de la zona híbrida, desencadenaría distintas interacciones bacteria-hospedador que finalmente podrían llegar a un nuevo equilibrio. Procesos de coevolución entre hospedador y bacteria similares han sido descritos en otros sistemas. De hecho se han llegado a describir casos en los que determinadas mutaciones en el hospedador modifican los efectos de *Wolbachia* (Charlat *et al.*, 2007). Este tipo de interacciones en todo caso serían complejas de inferir. Otras hipótesis, como procesos de selección estabilizadora que actuaran en esta zona, podrían del mismo modo discutirse.

### **34.7 Estructuración geográfica de las cepas detectadas.**

El MLST permite caracterizar al menos 5 complejos ST (Tabla 6), perteneciendo 3 de ellos al supergrupo F. Dichos complejos no se distribuyen aleatoriamente en las distintas poblaciones analizadas, sino que presentan una estructura poblacional muy concreta. De este modo, podría caracterizarse, en líneas generales, una correspondencia entre los individuos puros Cpp y la

infección por el complejo Cp\_ST1, el complejo Cp\_ST4 con individuos pertenecientes a determinadas poblaciones híbridas, y el complejo Cp\_ST5 con individuos puros Cpe, así como algunos individuos híbridos (Tabla 6).

En relación al supergrupo B, existe una distribución de los complejos de modo que el complejo Cp\_ST2 se encuentra por la mayoría de poblaciones puras de *C. parallelus*, donde se ha descrito la infección por el supergrupo B, mientras que el complejo Cp\_ST3 se distribuye principalmente en poblaciones pirenaicas de la zona híbrida.

Al combinarse los “patrones de infección” caracterizados en base a las frecuencias de infección (Fig. 28) acorde con Zabal-Aguirre *et al.* (2010), junto con los distintos complejos Cp\_ST descritos en este estudio, se pueden describir a las poblaciones de la zona híbrida del siguiente modo:

- (i) Podemos detectar individuos infectados por el supergrupo B (complejo Cp\_ST2), con distintas frecuencias, en todas las poblaciones analizadas de la especie *Chorthippus parallelus*, a excepción de la población de Bubión (Sierra Nevada), donde los niveles de coinfección están dentro del rango de error, así como niveles muy bajos en poblaciones al norte de Inglaterra y de Eslovenia. El complejo Cp\_ST3 se ha detectado principalmente en poblaciones híbridas.
- (ii) Las poblaciones puras de Cpp, pertenecientes al previamente denominado “Patrón del norte”, se caracterizarían por niveles bajos de infección (siendo en su caso mayoritariamente por el supergrupo B). La infección por el supergrupo F en estas poblaciones, aunque minoritaria, estaría constituida por cepas pertenecientes al complejo Cp\_ST1.
- (iii) Cabe destacar que este complejo Cp\_ST1 se ha detectado, además de en las poblaciones del extremo francés de la zona híbrida (donde los niveles de infección son muy bajos), en la población de Bubión (Sierra Nevada), donde es la cepa mayoritaria y cuyas frecuencias de infección rondan el 96% (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Este complejo también ha sido detectado en las poblaciones de Eslovenia, y Alpes.
- (iv) Las poblaciones puras de Cpe situadas en torno al Sistema Central, por ejemplo Navafría (Fig. 26 y de las Fig. 50 a Fig. 56), se caracterizan por niveles altos de infección, principalmente por el supergrupo F. En estas poblaciones se han detectado variantes ST que pertenecen al complejo Cp\_ST5, conservado tanto en poblaciones ibéricas alejadas

de la zona híbrida (Sistema Central) como en poblaciones híbridas, cercanas al extremo español.

- (v) Dentro de la zona híbrida, la población de Sallent de Gállego presenta altos niveles de coinfección (Fig. 26) por los supergrupos F y B, por lo que en relación a sus frecuencias de infección, ha sido clasificada como un patrón geográfico independiente (“Patrón de Sallent”). Respecto a los complejos ST que son responsables de la infección, los individuos infectados por el supergrupo F, pertenecerían al complejo Cp\_ST5, y al complejo Cp\_ST2 en el caso de los infectados por B.
- (vi) Finalmente, en las poblaciones híbridas (en el centro de la zona híbrida y pertenecientes por sus niveles de infección al “Patrón del norte”), encontraríamos los complejos Cp\_ST3 y Cp\_ST4, derivados presumiblemente de eventos de recombinación que involucran tanto al supergrupo F, como a cepas pertenecientes del supergrupo B.

Esto implica un patrón geográfico muy estructurado que podría tener importantes implicaciones en la zona híbrida.

Para corroborar esta estructuración geográfica se han realizado varios análisis mediante los software *Structure* (Evanno *et al.*, 2005) y *ClonalFrame* (Excoffier *et al.*, 2005), así como varias pruebas estadísticas, como el Test de Mantel y la AMOVA implementados en *ARLEQUIN* (Excoffier *et al.*, 2005).

### **34.8 Análisis de la estructuración geográfica mediante *Structure*.**

*Structure* implementa un algoritmo de agrupación que permite inferir la estructura genética de la muestra analizada, utilizando como datos de partida los genotipos de los individuos. El programa asume K poblaciones genéticas, cada una con una determinada frecuencia de alelos y posteriormente, asigna los distintos individuos a las K poblaciones propuestas. Finalmente, calcula la probabilidad de que dicha asignación sea adecuada. De este modo, podemos analizar qué hipótesis (qué número de poblaciones genéticas y la correspondiente asignación de individuo), sea más plausible.

Su uso está generalizado para el análisis de microsatélites, RFLPs y AFLPs. También, aunque menos conocido, es su uso para sistemas Multi-locus dado que una recodificación de las secuencias de ADN permite su análisis en base a sus posiciones polimórficas (Falush *et al.*, 2003a; Falush *et al.*, 2003b; Didelot *et al.*, 2011). En nuestro caso hemos empleado dos análisis

complementarios, en primer lugar cada individuo fue codificado acorde con su archivo alélico, es decir la combinación de alelos para los 5 loci del MLST. En segundo lugar, siguiendo la propuesta de Falush *et al.* (2003b) y Didelot *et al.* (2011), se recodificaron las posiciones polimórficas de las secuencias resultantes de la concatenación de los 5 *loci*, de modo que cada una sea considerada un *locus*. En el archivo de datos se mantuvo la separación entre los 5 loci del MLST, y se incluyó la distancia relativa entre las posiciones polimórficas.

Sin embargo, el uso de este software en secuencias moleculares presenta potencialmente un problema. *Structure* asume que no existe ligamiento entre las posiciones analizadas, y esta asunción no siempre es correcta en el análisis de las posiciones polimórficas (ver introducción, apartado “Análisis de la estructuración genética de las poblaciones mediante el software *Structure*”, así como el manual del software).

Para evitar el problema, algunos autores (Didelot *et al.*, 2011) proponen codificar dichas posiciones polimórficas, incluyendo la distancia relativa entre ellas y permitiendo al software utilizar esta información para el análisis mediante el submodelo *linkage model*. Este considera que las posiciones ligadas tienen una mayor probabilidad de proceder de una misma población. Los desarrolladores del software, por contra, sugieren utilizar como punto de partida la variante *Admixture model*, que considera que el genoma de cada individuo puede ser una mezcla de varias poblaciones ancestrales, debido a los eventos de recombinación. Los desarrolladores defienden que en general este modelo es suficientemente flexible para analizar gran parte de las poblaciones genéticas. El haber detectado cepas recombinantes en nuestro caso, apoya el uso este último.

Efectivamente, tanto en el caso de los datos alélicos, como en el caso del archivo de datos que incluía las posiciones polimórficas para los 5 *loci* se implementó el modelo *Admixture model*. Los ensayos previos demostraron que el modelo *No-admixture*, no permitía una buena resolución de la estructura, dando lugar a resultados caóticos, y que no podían relacionarse con ningún dato biológico, posiblemente debido a la recombinación detectada entre *loci*. A su vez, el *linkage model*, era demasiado estricto, y su resolución era peor que en el caso del *Admixture model*. Consideramos por tanto que el uso del *Admixture model* es justificable dado a la buena resolución para nuestros datos, así como su buena correspondencia con el resto de análisis.

Posiblemente *Structure* sea uno de los software más empleados para analizar la estructura poblacional, sin embargo, sus algoritmos presentan limitaciones y potencialmente pueden infra o sobreestimar el número de poblaciones distintas desde un punto de vista genético existentes en una muestra, esto es, asignar el valor de K. En este sentido, Pritchard *et al.*, (2000) mostraron la eficiencia del software para detectar entre 2 y 4 subpoblaciones dentro

de una muestra, pero observaron problemas cuando el número de poblaciones superaba un  $K=4$ , un valor relativamente bajo si se analizan datos moleculares (Evanno *et al.*, 2005).

Evaluar  $K$  en función del valor máximo de  $\ln(K)$  (Zeisset & Beebee, 2001; Ciofi *et al.*, 2002; Hampton *et al.*, 2004), es problemático cuando tras alcanzar la meseta se siguen incrementando ligeramente los valores de  $\ln(K)$ . Para evitar este sesgo, generalmente, se emplea la metodología para la asignación del valor de  $K$  propuesta por Evanno *et al.* (2005), basada en el valor del  $\Delta(K)$  en lugar de  $\ln(K)$ . Esta técnica permite caracterizar correctamente los principales *clusters* que explican el patrón de estructuración poblacional. Sin embargo, presenta limitaciones a la hora de evaluar la subdivisión de estos *clusters*. Por ello se sugiere realizar varios análisis: uno primero global, seguido de un análisis dentro de cada *cluster* principal.

Evanno *et al.*, (2005) valoraron la capacidad de *Structure* de resolver la estructura genética existente en una región de contacto entre dos poblaciones, subdivididas a su vez en poblaciones más pequeñas (en total  $K=10$ ). Previsiblemente, este podría ser el escenario más lógico en nuestro sistema (2 poblaciones, F and B, a su vez subdivididas), vistos los datos filogeográficos de los que disponemos. En las simulaciones se observaba que *Structure* resolvía bien los dos *clusters* principales, pero presentaba limitaciones a la hora de determinar las subpoblaciones. Por contra, en estas simulaciones, el valor máximo de  $\ln(K)$ , con  $K=13$ , se acercaba más a los valores *reales*, si bien, tendía a estimar al alza su número. En nuestro caso, en primer lugar hemos analizado de forma integral los datos pertenecientes a las cepas bacterianas de *Wolbachia*, sin valorar el supergrupo de pertenencia según los datos filogenéticos. En segundo lugar, se analizaron por separado los supergrupos F y B.

Debido a todo esto, consideramos necesario evaluar los resultados con una perspectiva biológica, para poder distinguir entre los posibles valores de  $K$ . A su vez, debido a las limitaciones de la técnica, sus resultados deben considerarse con precaución y combinarse con los de otros análisis. Por ejemplo, aquellos realizados mediante *ClonalFrame* (expuestos en la siguiente sección), cuyos resultados corroboran este primer análisis.

En el caso de los datos alélicos de cada individuo, independientemente del supergrupo, los datos apoyan claramente la subdivisión del supergrupo F en al menos 2 clases, cuyo límite coincide *grosso modo* con ambas vertientes pirenaicas. Si bien, parece coherente proponer un valor de  $K=3$  que separa claramente las cepas bacterianas del supergrupo F detectadas mayoritariamente en las poblaciones centrales de la zona híbrida, de aquellas que se han detectadas a sus lados, que conformarían dos grupos independientes.

El análisis independiente del supergrupo F parece reforzar esa idea. A su vez, permite proponer una subdivisión que facilitaría distinguir muchas de las cepas bacterianas detectadas

en la zona híbrida, de aquellas presentes en la zona central de Península y el resto de poblaciones europeas. En nuestro caso, existen distintos datos que proponen la diferenciación de las poblaciones bacterianas del centro de la zona híbrida (aparición recurrente de cepas recombinantes, alelos raros, genealogías propuestas mediante *ClonalFrame*), por lo que consideramos que este valor de  $K=3$  no debe descartarse, pese a que la metodología propuesta por Evanno *et al.* (2005) sea más estricta, y sólo resulte en dos grupos principales.

En el caso del supergrupo B el patrón es más claro, dado que ambas metodologías respaldan que el valor más probable de  $K$  sea  $K=2$ . Esta subdivisión distingue a las poblaciones de la zona híbrida, de otras externas.

En relación a los datos correspondientes a las posiciones polimórficas de los 5 loci analizados, nuestros resultados respaldan la subdivisión de las cepas pertenecientes al supergrupo F en los dos grandes grupos sugeridos previamente. A su vez apoyarían la subdivisión de aquellas cepas que han sido detectadas en las poblaciones centrales de la zona híbrida. Por otro lado, el supergrupo B es relativamente homogéneo, destacando la presencia de cepas recombinantes que son separadas del resto en un nuevo *cluster*.

### **34.9 Análisis de la estructuración geográfica mediante *ClonalFrame*.**

Este análisis se ha diseñado específicamente para caracterizar distintos clados bacterianos, mediante la reconstrucción de genealogías, en base a datos MLST. Una característica de este algoritmo, basado en IB, es permitir y analizar de forma específica los posibles eventos de recombinación entre *loci* (Didelot & Falush, 2007).

Su desarrollo estuvo motivado por los potenciales problemas que la recombinación puede provocar a la hora de inferir la filogenia de grupos bacterianos utilizando metodologías tradicionales (Posada *et al.*, 2002), dado que estos procesos podrían provocar una sobrestima de la distancia genética entre cepas (Schierup & Hein, 2000). Para evitar estos problemas se diseñaron los sistemas multilocus, de tal forma que se utilizara la asignación numérica de cada alelo (y no su secuencia), para inferir las relaciones entre cepas próximas. Por un lado los *loci* estarían suficientemente lejos para que no les pudiera afectar los mismos eventos de recombinación, pero a su vez presentaba una limitación obvia, al considerar igual dos alelos que diferían en un único nucleótido, que dos alelos muy distantes (Maiden *et al.*, 1998). Este mismo problema se daría en el análisis realizado en *Structure* basado en la asignación alélica de cada individuo. *ClonalFrame*, presenta una alternativa a estos análisis basados en la asignación alélica, al considerar la secuencia completa de estos alelos, a la vez que su algoritmo incluye tanto la

evolución de secuencias debido a la acumulación de mutaciones puntuales, como la existencia de recombinación entre *loci* (Didelot & Falush, 2007).

Los resultados de la reconstrucción de las genealogías bacterianas nos permiten ver una alta estructuración en el supergrupo F, en el cual, pueden distinguirse 4 grandes grupos (i) Sistema Central y Pirineos, (ii) resto de Europa y Bubión, (iii) Poblaciones francesas de la zona híbrida y (iv) cepas recombinantes detectadas mayoritariamente en la zona híbrida. Esta estructuración tan clara, coincide con los datos filogeográficos recogidos en los resultados del test de AMOVA, con la mayor diferenciación de las poblaciones en relación a su distancia geográfica (Test de Mantel), así como con la clasificación de las cepas siguiendo el MLST. Un patrón tan estructurado, acorde con los patrones de expansión del hospedador, respalda la hipótesis de que este supergrupo haya co-evolucionado con su hospedador durante la divergencia en alopatría de las poblaciones ibéricas, y aquellas que se refugiaron en los Balcanes. A su vez, la divergencia entre la infección detectada en Bubión (Sierra Nevada) y en el Sistema Central, puede ser indicativa de la existencia de varios refugios dentro de la Península Ibérica durante el periodo glacial. Hipótesis apoyada por los datos disponibles en otras especies, y que describe un escenario de “refugios dentro de refugios” (Bella *et al.*, 2007; Gomez & Lunt, 2007). Por su parte, las cepas B de *Wolbachia* presentan una menor diversidad y, en su caso, podrían destacarse algunas cepas, detectadas a su vez en las poblaciones centrales de la zona híbrida. Sin embargo, esta subdivisión, es fruto de la presencia de determinados alelos propios que coinciden, a su vez, con la clasificación de las cepas realizada en base al MLST. En este caso, el test de AMOVA no indicaba diferenciación poblacional significativa. Estos datos respaldan el origen independiente de ambos supergrupos en *C. parallelus*, así como una dinámica totalmente distinta de la infección. Se discutirá más adelante el origen más reciente de la infección por B, mediado posiblemente por transmisión horizontal.

#### **34.10 Comparación entre los resultados de *Structure* y *ClonalFrame*.**

La congruencia entre ambos análisis nos permite sostener de forma más fiable la existencia de varios grupos genéticos en las cepas detectadas de *Wolbachia* en *C. parallelus*. Ambos programas están enmarcados en distintos modelos evolutivos. Así pues, *Structure* asume que cada muestra es potencialmente una mezcla de los genomas de poblaciones ancestrales, no necesariamente relacionadas. Por contra, *ClonalFrame* tiene un marco filogenético, en el cual todas las muestras están relacionadas entre sí, dando lugar a una genealogía que en ocasiones se oscurece como consecuencia de la recombinación (Didelot *et al.*, 2011). Debido a esto, en principio *Structure* facilitaría la descripción de los distintos grupos genéticos en organismos con



elevadas tasas de recombinación, en los que la señal filogenética se hubiera prácticamente perdido, mientras que *ClonalFrame* sería útil en aquellos casos en los que, si bien existe recombinación, ésta no es tan elevada como para que la señal filogenética se pierda por completo. Este último modelo se ha implementado con este propósito en otras bacterias, como *Salmonella enterica* (Didelot *et al.*, 2011) o *Yersinia pestis* (Morelli *et al.*, 2010); presumiblemente, sería el caso de *Wolbachia*.

El análisis de posiciones polimórficas llevado a cabo mediante *Structure* nos permite discernir entre varios grupos genéticos. Tras considerar el análisis conjunto y el de las subpoblaciones, podemos distinguir 2 grupos principales dentro de las cepas asignadas al supergrupo F, correspondientes a (i) las cepas ibéricas y aquellas originarias de Europa (también presentes en Bubión (Granada)), y (ii) las cepas francesas pertenecientes a la zona híbrida a las que se asocian otras cepas F, también recombinantes. Debemos tener en cuenta que las cepas pertenecientes al supergrupo F detectadas en poblaciones como Gabas (extremo francés de la zona híbrida), han sido descritas como recombinantes, teniendo su origen posiblemente en las cepas europeas. Además se distinguen (ver figuras 64 y 65) grupos minoritarios que incluyen varias cepas también recombinantes. Esta agrupación parece lógica desde el punto de vista biológico, y podría estar relacionado con el origen de la infección en este ortóptero y su co-divergencia con el hospedador.

Por otro lado, el supergrupo B parece relativamente homogéneo, existiendo una segunda población genética constituida por cepas recombinantes y detectadas principalmente en la zona híbrida. Finalmente, se observa un clado que engloba gran parte de las cepas recombinantes.

El análisis mediante *Structure*, basado en el archivo alélico de cada individuo, nos permite una buena resolución de la estructura poblacional, coincidente *grasso modo* con los clados propuestos por *ClonalFrame*. El análisis realizado mediante este último software describe un mínimo de 5 clados. 3 de ellos son cepas pertenecientes al supergrupo F: (i) cepas ibéricas, (ii) europeas, (iii) cepas francesas pertenecientes a la zona híbrida. Por lo que parece distinguir claramente entre las cepas europeas y aquellas detectadas en el centro de la Península Ibérica. Un cuarto clado engloba las cepas del supergrupo B, y finalmente, el quinto incluye cepas recombinantes. La diferencia más notable se centra en la relación entre las cepas descritas en las poblaciones francesas de la zona híbrida, y las cepas recombinantes. *ClonalFrame*, asocia ambos grupos, pese a mantenerse en dos clados independientes, mientras que *Structure* asocia a las cepas detectadas en Arudy o Gabas (Cp\_ST11), con aquellas detectadas en otras poblaciones europeas (Cp\_ST12). La razón de esta discordancia podría deberse a que, pese a que las cepas de

Gabas y otras poblaciones europeas, como Alpes, son muy similares, las primeras (Cp\_ST11) han sido descritas según el análisis mediante *RDP4* como cepas recombinantes, presentando ciertas similitudes con las descritas en las poblaciones de la zona híbrida de Portalet o Tourmont.

Esto provocaría que mientras un análisis mediante *Structure* basado en la asignación alélica no pudiera distinguirlas de las cepas europeas (Cp\_ST11 frente a Cp\_ST12), el análisis detallado de las secuencias moleculares permitiera su clasificación en un clado independiente y relacionado con las poblaciones híbridas. Esto concuerda con la distinta filosofía del algoritmo de ambos programas, y ratifica que posiblemente un análisis de genealogías como el que se realiza mediante el *ClonalFrame* es más adecuado para esta bacteria.

Por su parte, el análisis mediante *Structure* basado en las posiciones polimórficas de las secuencias, parece tener una menor resolución respecto a los resultados de *ClonalFrame*. Este análisis sólo distinguía dos grandes grupos adscritos al supergrupo F, junto con grupos residuales, asociados a cepas recombinantes. Las mayores incongruencias están precisamente relacionadas con varias cepas recombinantes, cuya asignación mediante *Structure* es dudosa. Esto respalda la conclusión anterior, por la cual *ClonalFrame* parece un sistema de análisis más adecuado que *Structure* en el caso de *Wolbachia*, o al menos con una mayor capacidad de resolución.

### **34.11 Análisis de la varianza molecular y Test de Mantel.**

#### *Supergrupo F.*

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) es una técnica que nos permite valorar la hipótesis de estructuración poblacional en función de los grupos asignados *a priori* por el observador. En nuestro caso utiliza la variabilidad en las secuencias de ADN de los distintos *loci* analizados para las cepas de *Wolbachia* detectadas en cada población, para valorar si existe estructuración poblacional. Este análisis sigue la metodología propuesta entre otros por Stanley *et al.* (1996); Pérez-Lezaun *et al.* (1999); Jason *et al.* (2004) y Rasgon *et al.* (2006a), testándose varias agrupaciones acorde con los datos filogeográficos de los que disponemos *a priori*. De esta forma, “la agrupación que maximiza el valor de  $F_{CT}$ , siendo significativo frente a una distribución aleatoria de las poblaciones, se asume como la subdivisión más probable” (Stanley *et al.*, 1996).

Los resultados mostraron una clara estructuración poblacional, apoyando la hipótesis previamente sugerida por el resto de análisis. La agrupación de las poblaciones se realizó de acuerdo con los datos filogeográficos previos. El estudio sugirió la siguiente agrupación: i) las poblaciones de Cpe localizadas en el centro de la Península Ibérica, junto con las poblaciones denominadas Pirineo Sur (Puerto Cantó y Sabiñánigo), Escarrilla y Sallent de Gállego; ii) Corral de

Mulas, Portalet y C. Tourmont, donde se habían detectado cepas recombinantes; iii) poblaciones francesas de la ZH; iv) aquellas situadas en el norte de la Península Ibérica, así como el resto de poblaciones europeas y la población granadina de Bubión.

Los resultados mostraron una elevada diferenciación entre los haplotipos detectados en las distintas regiones geográficas evaluadas, sugiriendo la existencia de barreras notables a la expansión de la infección entre poblaciones alejadas apenas unos kilómetros. La variación entre grupos supone en este caso un 39% de la observada. Estos valores son similares a los encontrados, por ejemplo, en los estudios de la diversidad del ADNmt humano, considerándose en este caso que indican una elevada estructuración poblacional, relacionada con las migraciones humanas (Jason *et al.*, 2004). El test AMOVA *locus by locus* a su vez nos permite observar una alta estructuración poblacional que se mantiene de forma independiente en cada uno de los 5 *loci* analizados. Únicamente este valor es menor en el caso del gen *hcpA* ( $F_{CT}=0,3907$ ,  $p=0,012$ ). Esto coincide con la presencia de un mayor número de alelos para este gen, provocando que se incremente la diversidad de las cepas bacterianas dentro de los grupos, principalmente en el grupo asignado a las poblaciones de la zona híbrida. Pese a ello, la alta coherencia entre *loci* nos hace concluir que en el caso de este supergrupo bacteriano, los patrones demográficos son la principal causa de la distancia genética entre poblaciones, y no tanto las fuerzas evolutivas que pudieran actuar en los *loci* de forma independiente. Esto apoya la hipótesis (que expondremos posteriormente) por la cual este supergrupo hubiera codivergido en alopatría junto con las poblaciones de su hospedador, durante la última glaciación.

A su vez, dentro de cada grupo se observa una diferenciación importante entre las poblaciones incluidas en él, responsable del 46% de la diversidad total observada en el test AMOVA. Esto refleja la aparición de genotipos únicos, o en una mayor frecuencia de estos genotipos en determinadas poblaciones. Por ejemplo, la población de Navafría del Sistema Central ibérico presenta un único ST, el Cp\_ST25, frente a otras poblaciones dentro de su grupo en el que observamos más diversidad.

Hay que destacar que uno de las agrupaciones propuestas incluye poblaciones del centro de la zona híbrida, diferenciándose significativamente del resto de grupos. Este resultado refuerza la identidad propia de las poblaciones de la zona híbrida respecto al resto de ellas, tanto de la región central de la Península y el extremo sur de la zona híbrida, como de aquellas situadas en el extremo norte de la misma. Estos datos reflejan la presencia de cepas recombinantes, así como de alelos raros en estas cepas bacterianas, que divergen de las cepas originales presentes a escasos kilómetros a ambos lados de la zona híbrida. A su vez, muestra una expansión muy limitada de estas cepas recombinantes presentes mayoritariamente en

poblaciones híbridas, a las poblaciones puras próximas. Esta estructuración tan patente, y entre poblaciones tan cercanas, apoya la existencia de una barrera a la expansión de *Wolbachia* a lo largo de la zona híbrida. La naturaleza de dicha barrera debe estar relacionada, en ausencia de otras evidencias, con una tasa baja de migración (y reproducción en las poblaciones de destino) de su hospedador.

Esto refuerza el papel que la interacción de las incompatibilidades genómicas con la incompatibilidad citoplasmática tienen en la dinámica de la zona híbrida: Se ha observado que incluso tasas de migración muy bajas permiten la expansión de la infección desde una población infectada a otra que no lo está, lo que limitaría el efecto de la IC en el proceso de especiación (Telschow *et al.*, 2002b; a; Telschow *et al.*, 2005b; Flor *et al.*, 2007; Hilgenboecker *et al.*, 2009). Niveles intermedios de IC como los que se han estimado en *C. parallelus*, (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010) pueden ralentizar esta expansión, pero no la evitan. A su vez, la existencia de incompatibilidades genómicas acordes con el modelo de Dobzhansky-Muller, o aquellas que concuerdan con la regla de Haldane, raramente evitan la homogeneización de las poblaciones en ausencia de selección a ambos lados de la zona híbrida (Hilgenboecker *et al.*, 2009). Por tanto, la explicación más probable para este escenario sería la interacción sinérgica entre las incompatibilidades nucleares entre las subespecies y la existencia tanto de IC unidireccional, como de IC bidireccional (Hilgenboecker *et al.*, 2009). Este escenario será desarrollado en la sección “Infección por los supergrupos F y B de *Wolbachia* en *C. parallelus*: importancia de la existencia de varios supergrupos infectando a *C. parallelus*”.

Por otro lado, nos interesa valorar el flujo genético entre poblaciones, asociado a la distancia geográfica entre poblaciones. El test de Mantel proporciona una herramienta en este sentido.

Podemos observar una estructuración espacial en las poblaciones, de modo que poblaciones bacterianas más próximas tienden a ser más similares desde un punto de vista genético. Sin embargo, esta correlación no es muy alta ( $r=0,3381$ ). El motivo más probable es la presencia de los mismos STs en poblaciones alejadas (por ejemplo, la presencia del Cp\_ST25 en las poblaciones de Puerto Cantó (Pirineos), y Navafría, alejadas unos 400 km (ver Fig. 26)), junto con la rápida transición entre complejos ST a lo largo de poblaciones que apenas están separadas unos kilómetros a lo largo de la zona híbrida.

Debemos tener en cuenta que la estructuración geográfica que observamos está relacionada con los ciclos de expansión y retracción poblacional del hospedador, por lo que los factores demográficos son muy relevantes. De este modo, la estructuración observada debe interpretarse con la presencia de patrones de infección característicos a lo largo de regiones

geográficas amplias, y que se relacionan con la distribución de una determinada subespecie del hospedador. En este contexto, la zona híbrida es una región de transición entre los patrones de infección asociados a cada subespecie, lo que resulta sin duda, llamativo.

Un resultado sorprendente, ha sido la infección por el complejo Cp\_ST1 de la población de Bubión (Sierra Nevada), que puede ser interpretado según varias hipótesis. Sin embargo su inclusión en un análisis que no tiene en cuenta estos factores demográficos, puede ensombrecer los resultados. Por ello, hemos querido repetir el test de Mantel, excluyendo a la población de Bubión del análisis. Como era esperable, se observa un incremento en la correlación existente entre la diversidad bacteriana y la distancia geográfica de las poblaciones estudiadas ( $r=0,4838$ ,  $p=0,003$ ), corroborando la estructuración poblacional comentaba previamente.

### *Supergrupo B:*

En el caso del supergrupo B, se observa un patrón totalmente distinto. No existe estructuración poblacional, las cepas pertenecientes a este supergrupo se pueden detectar en poblaciones muy distantes, por lo que el test de Mantel no es significativo ( $rY1: -0,214329$ ;  $p\text{-valor}=0,831$ ). A su vez, el test AMOVA no permite observar una estructura clara, los valores de  $F_{SC}=0.1666$  ( $p=0,110$ ),  $F_{ST}=0,3112$  ( $p=0,174$ ) y  $F_{CT}=0,1735$  ( $p\approx 0,000$ ), reflejan una ligera estructuración, que atribuimos a las poblaciones de la zona híbrida, frente al resto de grupos.

Estos resultados son coherentes con un patrón rápido de expansión de la infección que haya permitido que se puedan detectar cepas idénticas en poblaciones alejadas miles de kilómetros. Este patrón tan diferente entre el supergrupo F, con una elevada estructura poblacional, y el supergrupo B, sin esta estructura tan definida, además de apoyar claramente la existencia de dos eventos diferentes de infección por ambos supergrupos (resultado sustentado por el resto de datos) sugiere una epidemiología muy diferente entre ambos supergrupos.

Cabe destacar que el supergrupo B se caracteriza según los estudios de Russell *et al.*, (2009) por una escasa estructuración geográfica, así como por un rango de hospedador muy amplio. Cepas muy similares pertenecientes a este supergrupo se han detectado en poblaciones separadas por miles de kilómetros, en diferentes continentes y en hospedadores extremadamente diversos. Esto apoya la posibilidad de que las cepas de este supergrupo tengan una mayor capacidad para transmitirse horizontalmente. Este punto será discutido posteriormente a la hora de analizar el posible origen de la infección, así como en el apartado destinado a discutir la transmisión horizontal de *Wolbachia* en *C. parallelus*.

### 34.12 El sistema de clasificación mediante el gen *wsp*.

El sistema de clasificación de cepas mediante el gen *wsp* es una metodología complementaria al MLST, pero según sus propios autores, nunca alternativa (Baldo *et al.*, 2006b; Baldo & Werren, 2007). Está basado en la inferencia de la secuencia aminoacídica de una proteína de membrana (*wsp*) obtenida tras la caracterización y traducción de su gen codificante, también llamado *wsp*. Este sistema es análogo al de tipificación de antígenos empleado para clasificar bacterias patógenas (Pérez-Losada *et al.*, 2005). Este método alternativo favorecería la caracterización de las cepas bacterianas debido a la elevada recombinación detectada en este gen, así como por su alta variabilidad (Baldo *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2006a; Baldo *et al.*, 2006b; Baldo & Werren, 2007).

El *locus wsp* fue uno de los primeros marcadores empleado para la clasificación de las distintas cepas de *Wolbachia*. Sin embargo, posteriormente se comprobó la existencia de altas tasas de recombinación entre cepas, por lo que su utilidad para estudios filogenéticos se puso en duda. De hecho se detectaron discrepancias importantes entre los resultados propuestos por el MLST, y el gen *wsp* (Baldo *et al.*, 2005). En nuestro caso, la asignación de los alelos a los supergrupos F y B ha sido clara, sin embargo, se han detectado individuos cuya adscripción a un supergrupo difiere en función de si se selecciona como referencia el gen *wsp*, el gen *16S rRNA* o el MLST. Por ejemplo, el alelo *wsp*-1 (adscrito al supergrupo B) se detectó en 5 individuos (de 83 analizados) previamente caracterizados como pertenecientes al supergrupo F. Este hecho ya se ha constatado con otros marcadores, y nos indica que el genoma de algunas cepas de *Wolbachia*, no es si no un mosaico (Baldo *et al.*, 2005).

Las proteínas de membrana, al menos en bacterias patógenas, actúan como antígenos, y su evolución esta dirigida fundamentalmente por selección y recombinación (Andrews & Gojobori, 2004). En este sentido, la recombinación puede ser una fuente acelerada de variación, con implicaciones importantes en la relación entre la bacteria y el hospedador, por ejemplo a nivel de reconocimiento del sistema inmune (como ocurriría en vertebrados). A su vez, la detección de selección positiva en este tipo de proteínas, hace sospechar que tengan un papel importante en la adaptación de las cepas de *Wolbachia* a su hospedador (Jiggins *et al.*, 2002b). De ahí, que esperáramos una relación estrecha (incluso más que en el caso del MLST) entre las variaciones de *Wolbachia* detectadas y las poblaciones en las que se han detectado.

El análisis filogenético de las cepas corrobora la existencia de alelos de *wsp* clasificados dentro de los supergrupos F y B. Por su parte, el de la estructuración filogeográfica de las cepas detectadas, mostró que los alelos del gen *wsp* no se distribuyen aleatoriamente en las distintas

poblaciones analizadas, presentando estructuración poblacional similar a la que mostraban otros marcadores (Fig. 56). La clasificación realizada mediante la asignación de regiones aminoacídicas de secuencia única, mostró una gran divergencia entre las cepas presentes en las poblaciones europeas no ibéricas (y Bubión), respecto a aquellas detectadas en las poblaciones del centro peninsular y en las poblaciones del extremo español de la zona híbrida. Al igual que sucedía con el MLST, los alelos adscritos a cepas B eran muy similares, y parecidas a las ya descritas en un gran número de géneros distintos (*Nasonia* sp., *Tetranychus* sp., *Rhagoletis* sp., *Acraea* sp....), lo que apoya una infección *de novo* desde otro hospedador.

Por contra, el supergrupo F presentaba una mayor diversidad, detectándose dos grandes grupos. Los alelos más cercanos se encuentran en cepas que infectan al género *Apoica* sp. (Himenoptera), así como al género *Opisthophthalmus* sp. (Scorpidae) (Baldo *et al.*, 2007). Estos datos no son muy relevantes a la hora de inferir el origen de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus* al existir en la bibliografía un número muy limitado de alelos caracterizados para el supergrupo F. Por esto, consideramos que en el caso concreto de las cepas F de *Wolbachia* que infectan a este ortóptero, el MLST puede ser actualmente el sistema más informativo. Sin embargo, debido a que es previsible que en un futuro se caractericen nuevas cepas pertenecientes a este supergrupo, consideramos que esta información llegará a ser útil. A su vez, debido al potencial papel que esta proteína puede tener en la adaptación entre el hospedador y la bacteria, consideramos importante su secuenciación, sin descartar futuros análisis para los que su caracterización pueda ser relevante.

### 34.13 Modos de adquisición de la infección.

Raychoudhury *et al.* (2009) propusieron 3 modos de adquisición de una nueva cepa de *Wolbachia*. Estas eran la transmisión horizontal de la infección, la introgresión híbrida y la codivergencia junto a un antecesor común del hospedador.

Generalmente, asumimos que *Wolbachia* se transmite de forma materna, y efectivamente ésta es la forma más frecuente de transmisión una vez que la infección se establece en una población (Serbus *et al.*, 2008). Sin embargo, desde el punto de vista evolutivo, es importante saber cómo se produce esa nueva infección.

Una de las ventajas del MLST es la caracterización detallada de las cepas bacterianas, pese a sus limitaciones, lo que en teoría permitiría rastrear las distintas cepas a nivel mundial, y reconstruir la forma en que han infectado a los nuevos hospedadores. A su vez, los autores de la metodología defienden la posibilidad de asociar a determinadas cepas con regiones geográficas,



condiciones ecológicas, filogenia del hospedador y los fenotipos que éstos manifiestan (Baldo & Werren, 2007; Baldo *et al.*, 2008). En nuestro caso, además de caracterizar la diversidad de la infección de *Wolbachia* en *Chorthippus parallelus*, estamos interesados en determinar el modo en que se produjo la infección en un primer momento, así como en asociar las distintas cepas detectadas con la distribución geográfica del hospedador, permitiéndonos inferir el papel que pudo tener la infección por *Wolbachia* en la formación y la posterior dinámica de la zona híbrida.

La incongruencia entre la filogenia de *Wolbachia* y sus hospedadores ha hecho sugerir a numerosos autores la posibilidad de que la transmisión horizontal sea un fenómeno más frecuente en la naturaleza de lo que aparentemente parecía. A su vez los experimentos de micro-inyección entre especies no relacionadas, así como el hecho de localizar cepas muy similares en especies lejanas respalda este hecho (Boyle *et al.*, 1993; Dunn & Rigaud, 1998; Grenier *et al.*, 1998; Jochemsen *et al.*, 1998; Cook & Butcher, 1999; Heath *et al.*, 1999a; Heath *et al.*, 1999b; Vavre *et al.*, 1999a; Noda *et al.*, 2001b; Hughes *et al.*, 2004; Haine *et al.*, 2005a; Russel & Moran, 2005; Batista *et al.*, 2010; Zug *et al.*, 2012). También se ha demostrado, incluyendo este trabajo, que poblaciones de una misma especie geográficamente lejanas, pueden estar infectadas por cepas bacterianas muy distantes filogenéticamente (Baudry *et al.*, 2003; Shoemaker *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004; Riegler *et al.*, 2005). A su vez, una determinada especie puede estar infectada por varias cepas distintas de *Wolbachia*, lo cual también se ha demostrado en el contexto de esta tesis doctoral (Bordenstein & Werren, 1998; Jeyaprakash *et al.*, 2009; Schuler *et al.*, 2011).

En este trabajo también discutimos el papel que ha podido tener la transmisión horizontal de la infección en la actual distribución de las distintas cepas bacterianas en este hospedador (ver sección “Filogenia y Filogeografía de *Wolbachia*”, pág. 248). Sin embargo, otros procesos por los cuales la bacteria puede infectar a un nuevo organismo no están tan claros.

En primer lugar, nos centraremos en analizar los procesos de codivergencia que han tenido lugar entre las cepas F que actualmente infectan a *C. parallelus*. Por otro lado, estudiaremos la infección por el supergrupo B.





#### **34.14 El origen de la infección en *C. parallelus*.**

##### **34.14.1 Supergrupo F.**

Determinar el origen de la infección por este endosimbionte en *C. parallelus* es un punto de extremo interés para poder discernir, una vez comprobado que existen fenómenos de IC unidireccional y bidireccional entre supergrupos (Zabal-Aguirre., com. pers.; Bella *et al.*, 2010), si la infección estuvo implicada en la formación de la zona híbrida en estudio, o si bien sólo interviene en su dinámica "a posteriori". Determinar si los complejos ST descritos dentro del supergrupo F estaban ya diferenciados cuando se formó la zona híbrida, o si bien son fruto de procesos recientes, condiciona igualmente el estudio de la infección en relación a la zona híbrida (Fig. 83).

##### **34.14.2 Diversidad dentro y entre complejos ST adscritos al supergrupo F de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus*.**

###### *Estimas de la divergencia entre cepas.*

El actual MLST permite clasificar las distintas cepas de *Wolbachia* con mayor exactitud frente a otros sistemas como el gen *16S rRNA*, muy conservado y que permite un análisis limitado a nivel de cepa, o el gen *wsp*, en el que se han descrito niveles muy altos de recombinación, así como selección diversificativa (Baldo *et al.*, 2005).

Para ello, en este estudio hemos amplificado y secuenciado los 5 genes del MLST en distintas cepas bacterianas distribuidas en poblaciones muy distantes, tanto híbridas como puras de este hospedador. Este análisis nos ha permitido caracterizar, en primer lugar, distintas cepas de *Wolbachia* en poblaciones distantes. Por otro lado, las filogenias realizadas tanto de los genes individuales, como de su secuencia concatenada, nos han permitido describir las relaciones de parentesco entre las cepas detectadas en *C. parallelus*, y en otros hospedadores.

Esto ha demostrado una mayor similitud entre las distintas secuencias de *Wolbachia* identificadas en *C. parallelus*, que entre éstas y las detectadas en otros organismos. Al menos cuando comparamos las secuencias reveladas en las poblaciones puras de *C. parallelus* del Sistema Central, y otras poblaciones europeas. Esto nos permite sugerir que *Wolbachia* pudo co-divergir con su hospedador durante la divergencia en alopatria de esta especie durante la última glaciación.

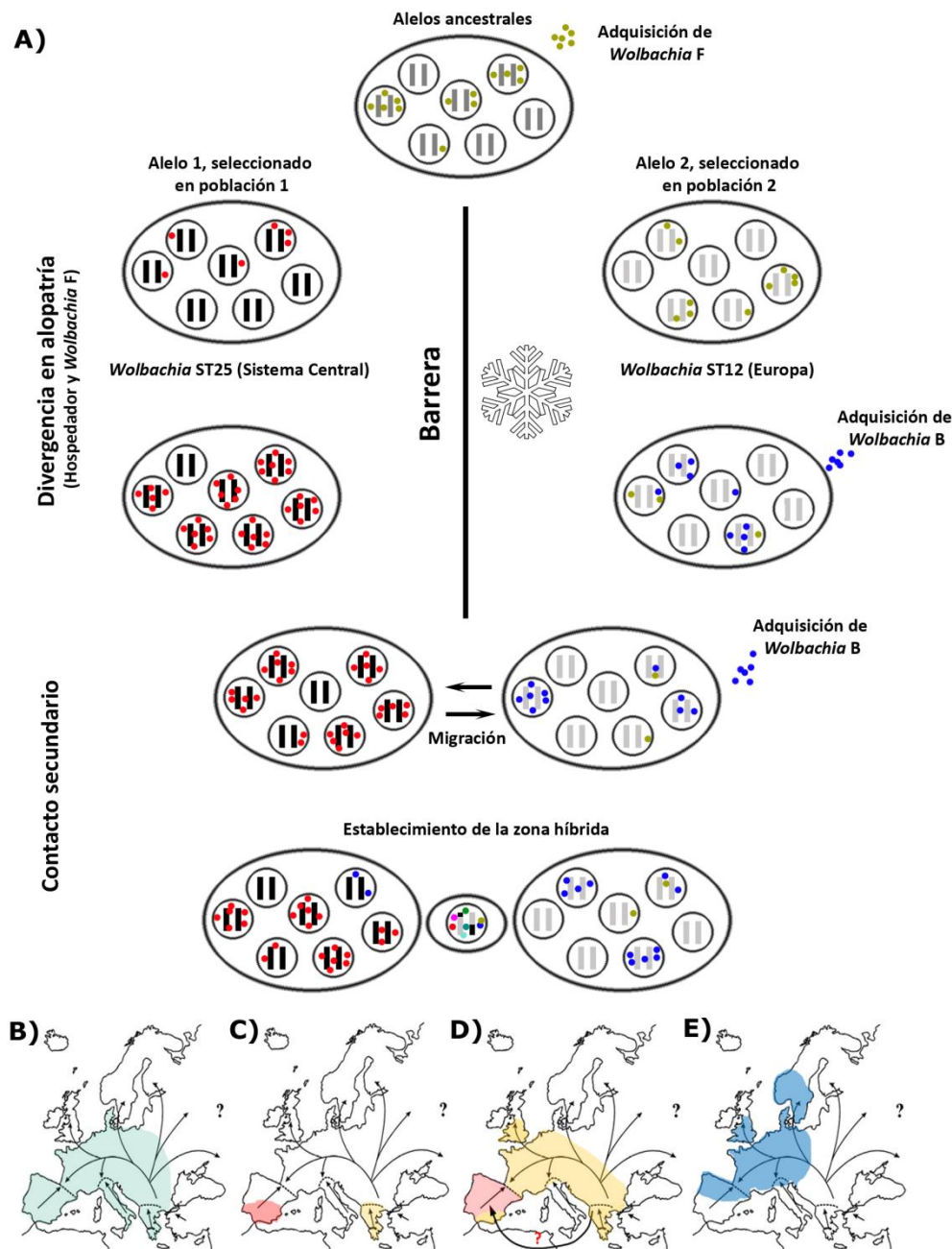


Fig. 83: A) Esquema mostrando la hipótesis propuesta para el origen de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*. Cada elipse representa una población y cada círculo interior, representa un individuo. Las barras negras y grises en su interior representan el genoma del hospedador, mientras que los puntos de colores indican el tipo bacteriano que infecta al individuo. El establecimiento de la zona híbrida supone la aparición de genomas recombinantes en el hospedador, y una elevada diversidad bacteriana, posiblemente inducida por la recombinación, en *Wolbachia*. B-E) Representación espacial de la expansión poblacional de la infección: las flechas indican la expansión poblacional de *C. parallelus*, tras la retirada de los hielos. B) Antes de la última glaciación la infección por el supergrupo F de *Wolbachia* era homogénea, C) Durante la última glaciación la infección divergió en alopatría, D) Tras la retirada de los hielos la infección se expande acorde con las migraciones de su hospedador, E) Por otro lado, la infección por B, se transmitiría (posiblemente por transmisión horizontal) a distintas poblaciones europeas.

La filogenia resultante de la concatenación de los distintos genes muestra la mayor relación entre las cepas Cp\_ST25 (Sistema Central y algunas poblaciones del extremo español de la zona híbrida) y Cp\_ST24 (extremo español de la zona híbrida), y entre las cepas Cp\_ST11 y Cp\_ST10, detectadas en la Europa no ibérica y la cornisa Cantábrica, respectivamente. Nuestros datos filogeográficos apoyan la relación existente entre la distribución actual de las cepas bacterianas, y las poblaciones puras o híbridas del hospedador, así como la diferenciación entre las cepas bacterianas que infectan a ambas subespecies. De ahí se deduce como hipótesis más probable que la actual infección por este supergrupo en las distintas poblaciones analizadas es el resultado de la codivergencia a partir de una cepa F ancestral de *Wolbachia* que infectaba a las poblaciones ancestrales de *C. parallelus*, anteriormente a la divergencia en alopatria de éstas.

La estimación de los tiempos de divergencia entre los complejos ST descritos puede ser problemática debido a la ausencia de datos paleontológicos o geológicos que nos permitan datar nuestros árboles filogenéticos.

Raychoudhury *et al.*, (2009) emplearon un reloj molecular de bacterias a modo de aproximación, para estimar los tiempos de divergencia entre cepas. Los estudios realizados por Ochman & Wilson (1987) y Ochman *et al.* (1999) permitieron calibrar un reloj molecular cuya estima resulta en un 0,90% de divergencia sinónima cada millón de años. Sin embargo, estas tasas pueden variar entre estirpes bacterianas, por lo que hay que considerarlas con precaución.

En cualquier caso, usando esta estima podemos inferir que, basándonos en cualquiera de los loci analizados, la divergencia entre los alelos adscritos al supergrupo F que actualmente detectamos en el centro de la Península Ibérica, y Eslovenia se estima entre 18.000-47.000 años dependiendo de los genes analizados. Estas estimas están posiblemente sobre-estimadas en el caso del gen *hcpA* (47.000 años), que presenta un mayor número de variantes alélicas que el resto de genes. Cualquier fuerza evolutiva que favoreciera nuevas variantes alteraría de forma considerable las estimas realizadas en base a este reloj molecular.

Considerando las secuencias concatenadas, la divergencia entre cepas (combinación de alelos) adscritas al supergrupo F detectadas en el Sistema Central (Cp\_ST25) y Eslovenia (Cp\_ST11) se aproxima a los 34.200 años. La divergencia entre las cepas bacterianas presentes en el Sistema Central (Cp\_ST25) y el norte de la Península (Cp\_ST10) es aproximadamente de 24.000 años. A su vez, una diferenciación entre las cepas detectadas en el Sistema Central (Cp\_ST25) y el sur del Pirineo (Cp\_ST24), es de unos 14.000 años.

Estas estimas por supuesto deben contemplarse con mucha cautela, más cuando existen procesos de recombinación que alteran las tasas de divergencia. Sin embargo, esta aproximación podría indicarnos que en el momento de la formación de la zona híbrida, hace unos 10.000 años

(Hewitt, 1993), ambos complejos ya estaban diferenciados, por lo que pudieron intervenir en el origen y dinámica de la zona híbrida.

En relación a estos datos, y como hemos comentado anteriormente, podríamos proponer un único origen “antiguo” de la infección por el supergrupo F, previo a la formación de la actual zona híbrida y su posterior divergencia en alopatría, asociado a la divergencia de las subespecies Cpp y Cpe. La hipótesis alternativa, dos orígenes independientes de la infección por el supergrupo F en esta especie, pierde fuerza en vista de los datos presentados en este estudio.

Como soporte a la primera hipótesis, la infección podría tener un origen africano, hipótesis secundada por la similitud con el supergrupo F que infecta a *Opisthophthalmus* sp. (ST-72), cuya distribución geográfica incluye el norte de África (Baldo *et al.*, 2007). Así pues, la infección por el supergrupo F podría haber sido transmitida mediante transmisión horizontal desde otro taxón, a poblaciones de *C. parallelus* del sur de Europa antes de la divergencia en alopatría de la especie. No se puede descartar la interacción entre ambos hospedadores, al haber ocupado ambos organismos hábitats cercanos en el pasado, previamente a la época glacial. Sin embargo los datos disponibles no nos permiten demostrar esta hipótesis. No hemos detectado cepas de *Wolbachia* adscritas al supergrupo F en otras especies de *Chorthippus* sp., por lo que no parece que este supergrupo haya estado vinculado a este género. Sin embargo, estos datos son muy preliminares y fruto de un muestreo sesgado, por lo que deben considerarse con precaución.

Este clon ancestral divergiría en las sucesivas expansiones poblacionales de individuos a las zonas medias de la Península, originando el complejo Cp\_ST25 característico de estas poblaciones centrales. A su vez, serían descendientes de estas poblaciones centrales de *C. parallelus erythropus* los que entrarían en contacto con *C. parallelus parallelus* en los Pirineos.

La detección del complejo Cp\_ST11 (propio de Eslovenia y otras poblaciones de la Europa continental) en la población de Bubión (Sierra Nevada), es un resultado inesperado. En esta población a su vez existe una infección prácticamente exclusiva por supergrupo F, y podría considerarse actualmente una de las más aisladas de la Península, puesto que no hay ecosistemas equivalentes cercanos a Sierra Nevada. No hay flujo génico posible entre los *C. parallelus* presentes en esta población y el resto de ellas, al menos actualmente. Los patrones de expansión demográfica después de la glaciación descritos en *C. parallelus*, nos harían suponer que la infección en esta población debería ser similar a la de las poblaciones del Sistema Central, pero no es así. Así mismo, cabe destacar la localización de cepas pertenecientes al mismo complejo (de acuerdo con los datos obtenidos mediante la secuenciación del gen *16S rRNA*) en

poblaciones del norte de Inglaterra. Estos datos parecen indicar un patrón de expansión demográfico del hospedador más complejo de lo inicialmente descrito.

En una de las hipótesis planteadas en esta tesis, el origen del supergrupo F en la población granadina de Bubión, podría deberse a una transmisión de la infección a posteriori “desde el sur”, desde poblaciones de *C. parallelus* que se hubieran expandido desde los Balcanes y Turquía hacia el Oeste, por el norte de África. Las poblaciones del sur de la península podrían haber estado aisladas de las poblaciones del Sistema Central, como sugiere la hipótesis “de refugios dentro de refugios”, lo que explicaría el patrón de infección actual (Bella *et al.*, 2007; Gomez & Lunt, 2007). Actualmente, las condiciones climáticas no permiten la existencia de poblaciones de *C. parallelus* en el norte de África, de hecho no se encontraron individuos de *C. parallelus* durante los muestreos realizados para la detección de poblaciones en la cordillera del Atlas (Prof. Jaime Gosálvez, com. pers.). Si embargo, esto no excluye la posibilidad de que el hábitat fuese adecuado durante la última glaciación.

En el caso de Bubión, los datos disponibles de la diversidad de ADNmt (Lunt *et al.*, 1998) revelan que las poblaciones del sur de España únicamente presentan el mitotipo 1 (presente en numerosas poblaciones de *C. parallelus*, independientemente de la subespecie, incluyendo poblaciones de Turquía, o del norte de Francia), lo que apoya la similitud de esta población con las poblaciones ancestrales de *C. parallelus* a nivel mitocondrial. La presencia de este único mitotipo concuerda con una infección *de novo*, que arrastraría los mitotipos presentes en estas poblaciones “origen” y que quedaría fijado en la población como consecuencia de las altas tasas de infección por *Wolbachia* detectadas en esta población.

Respecto a la presencia de este complejo ST en el norte de Inglaterra, la hipótesis más plausible es su transmisión desde las poblaciones de los Balcanes tras la divergencia entre Cpp y Cpe, durante la expansión de poblaciones del hospedador Cpp hacia el Norte-Este. Posteriormente la infección *de novo* por el supergrupo B podría haber desplazado a esta cepa hacia el norte de Inglaterra durante su expansión en las poblaciones inglesas.

La hipótesis contraria, por la cual la infección en la población de Bubión fuese consecuencia del mantenimiento de cepas ancestrales en esta población, que no hubieran divergido durante el aislamiento de la población es poco plausible. A su vez, esto no podría explicar la infección en el norte de Inglaterra, dado que en esa región no podrían haber permanecido las poblaciones ancestrales durante el periodo glacial.

Respecto a las diferencias en las frecuencias de infección a lo largo de las poblaciones, debemos tener en cuenta que durante las expansiones poblacionales del hospedador existirían fenómenos de deriva y efecto fundador que podrían favorecer tanto la divergencia entre

complejos ST y los incrementos en las frecuencias de infección en determinadas poblaciones, como por el contrario, la pérdida de la infección por el supergrupo F. A su vez, la introducción de una nueva cepa, por ejemplo el supergrupo B, podría alterar la dinámica de las poblaciones provocando cambios radicales en las frecuencias de infección por las cepas originales, e incluso inducir su extinción (Vautrin *et al.*, 2007; Vautrin *et al.*, 2008; Vautrin & Vavre, 2009).

Las altas frecuencias de infección características de las poblaciones centrales de la Península Ibérica pueden ser ejemplo de este tipo de eventos. El incremento de los niveles de infección posteriormente a la divergencia de las cepas bacterianas, concordaría con la reducción de la diversidad mitocondrial (*sweep selectivo*) observada en estas poblaciones (Lunt *et al.*, 1998). En estas poblaciones sólo se han detectado dos mitotipos: el mitotipo 1 (aparentemente ancestral debido a su amplia distribución en poblaciones de toda Europa, como ya se ha indicado), y el mitotipo 9, mucho más abundante y que se ha detectado de forma exclusiva en estas poblaciones, así como en las del norte peninsular.

En relación a las cepas bacterianas detectadas en la cornisa Cantábrica, éstas se asemejan más a las presentes en otras poblaciones europeas, que a aquellas presentes en el Sistema Central y el Pirineo. Sabemos por estudios previos de la introgresión de determinados marcadores citogenéticos propios de *C. parallelus parallelus* a las poblaciones ibéricas del norte peninsular (Bella *et al.*, 2007). Esto abre la posibilidad de que la introgresión entre ambas subespecies sea mayor en la región de Navarra, donde la menor altitud del Pirineo, permitiría incrementar la migración efectiva entre las distintas poblaciones a un lado y otro de la cordillera. Esto coincidiría con que la infección típica de estas poblaciones fuese muy similar a las cepas bacterianas presentes en las poblaciones eslovenas o de Alpes. A su vez, actualmente existiría una barrera geográfica, ecológica, entre estas poblaciones y aquellas ubicadas en el Sistema Central, que dificultaría la introgresión de esta infección a la región central. Las poblaciones del norte peninsular podrían ser un ejemplo de la pérdida parcial de la infección (*Wolbachia* F), seguida de la infección *de novo* por una nueva cepa B (o como consecuencia de ella). La pérdida de la infección durante las expansiones poblacionales es un proceso previamente detectado por ejemplo en algunas especies de hormigas (Reuter *et al.*, 2004; Koehncke *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

En el caso concreto de las poblaciones del norte de la Península cabe destacar la discordancia existente entre marcadores nucleares (Hewitt, 1993), citogenéticos (Bella *et al.*, 2007) y mitocondriales (Lunt *et al.*, 1998). Estos estudios han comprobado que si bien las poblaciones de Cpe del norte de España tienen un origen común con aquellas que existen actualmente en el Sistema Central, han divergido con posterioridad. Por otro lado, la presencia

del mitotipo 9, exclusivo de las poblaciones del Sistema Central y la cornisa Cantábrica, apoya su origen común. Finalmente, se ha observado introgresión de determinados marcadores citogenéticos, que apoyaría la idea de que la zona del Pirineo de Navarra sea un paso natural que permita una mayor migración entre las poblaciones de Cpe y Cpp, permitiendo el flujo de caracteres. Concretamente la presencia de cepas derivadas del complejo Cp\_ST1 de *Wolbachia* en estas poblaciones apoya la posibilidad de que la infección las haya infectado por introgresión desde los individuos de Cpp franceses infectados, tras lo cual las cepas habrían divergido ligeramente.

Este escenario es consistente con la estructura poblacional de "refugios dentro de refugios" propuesta a la luz de las diferencias nucleares, mitocondriales y cromosómicas observadas en esta especie (ver Shuker *et al.*, 2005a para una revisión).

#### **34.14.3 Supergrupo B.**

Al igual que hicimos para las cepas adscritas al supergrupo F, el MLST nos permite caracterizar las cepas adscritas a este otro supergrupo de *Wolbachia*, así como su posible origen.

#### **34.14.4 Diversidad dentro y entre complejos ST adscritos al supergrupo B de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus*.**

##### *Estimas de la divergencia entre cepas.*

En contra de lo que ocurría en el supergrupo F, la caracterización de las cepas B en poblaciones de ambos hospedadores (*C. parallelus parallelus* y *C. parallelus erythropus*), muestra que estas cepas son prácticamente idénticas. Sin embargo, se ha observado la aparición de nuevas cepas bacterianas de este tipo en las poblaciones híbridas del hospedador. Debido a la escasa divergencia entre cepas del supergrupo B de *Wolbachia* que infectan a poblaciones tan distantes de *Chorthippus parallelus*, se propone un origen reciente de la infección por este supergrupo, mediado bien por fenómenos de transmisión horizontal entre taxones, bien por introgresión de la bacteria tras el proceso de hibridación en los hospedadores (Raychoudhury *et al.*, 2009).

En el caso de este supergrupo, hemos observado además una alta similitud con cepas detectadas en múltiples organismos, incluidos coleópteros, lepidópteros, himenópteros, hemípteros y otros ortópteros, que en ocasiones comparten hábitat con las poblaciones de *C. parallelus* caracterizadas.

Entre las especies donde se han caracterizado alelos próximos se encuentran *Tetrastichus coeruleus*, *Nasonia vitripennis*, *Polistes dominulus* o *Tetrastichus coeruleus* (Himenoptera), *Hylyphantes graminicola* (Araneae), *Acraea eponina*, *Lycaeides idas*, *Libythea myrrha* (Lepidoptera), *Chelymorpha alternans*, *Tribolium confusum*, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera), *Teleogryllus taiwanemma* (Orthoptera), y *Laodelphax striatellus* y *Sogatella furcifera* (Hemiptera). Por otro lado, como parte de este estudio se han descrito cepas adscritas al supergrupo B muy similares en otros ortópteros que comparten hábitat con *C. parallelus* en la zona híbrida pirenaica (*Ruspolia nitidula*, *Chorthippus vagans*, *Euchorthippus chopardi*). A su vez, como parte de la colaboración con el Prof. Richard Nichols (QMWC, University of London, UK), se han caracterizado cepas muy próximas en individuos de otro saltamontes, *Podisma pedestris*, capturados en Alpes marítimos (Francia). A su vez, debemos recordar, aunque será comentado más adelante, la infección de parasitoides asociados a *C. parallelus*.

Estos datos nos permiten apoyar que la infección con estas cepas del supergrupo B de *Wolbachia* se haya producido por transmisión horizontal desde alguno de estos taxones. Por otro lado, la presencia de las mismas cepas bacterianas en poblaciones tan distantes como Navafría (Sistema Central) y Eslovenia permiten sugerir que esta infección, mediada por transmisión horizontal, responde a una expansión bacteriana reciente. No debe descartarse completamente la posibilidad de introgresión de la infección tras la hibridación de los parentales, aunque la presencia de cepas muy similares de este supergrupo en especies que comparten su hábitat con *C. parallelus*, apoya la hipótesis de transmisión horizontal (Raychoudhury *et al.*, 2009). Por otra parte, no hay la menor evidencia de flujo génico (en forma de introgresión de rasgos “*parallelus parallelus*”) entre las poblaciones del norte, y las del centro o el sur de España, por lo que el traspaso de la infección podría haber sido mediado por otras especies interpuestas.

A su vez, el que las cepas detectadas en la zona híbrida hayan divergido de las originales, es consistente con la hipótesis de que el entorno genómico de la zona híbrida haya favorecido los fenómenos de recombinación, así como la aparición de nuevas variantes, tras la formación de la zona híbrida.

La divergencia entre los distintos alelos adscritos al supergrupo B detectados en poblaciones puras e híbridas ronda los 10.000-35.000 años. De nuevo, debería considerarse con máxima precaución las estimas realizadas a partir del gen *HcpA* (35.000 años), debido al alto número de variantes que afectan a este gen. El resto de estimas moderan esta divergencia a unos 10.000-15.000 años. La secuencia de loci concatenados que caracteriza a las distintas cepas (o STs) adscritas al supergrupo B nos indica una divergencia de las secuencias en torno a los





5.000-7.000 años. Mucho más reciente en todo caso que el supergrupo F previamente descrito, y muy en la línea del origen propuesto para el contacto secundario entre *C.p. parallelus* y *C.p. erythropus* que dio lugar a la zona híbrida pirenaica (estimado en 9000 años (Hewitt, 1988).

Debemos tener en cuenta que podríamos cometer cierto error a la hora de estimar la divergencia entre las cepas bacterianas detectadas en poblaciones puras del hospedador, en las que no se han detectado eventos de recombinación, y aquellas cepas bacterianas caracterizadas en poblaciones híbridas donde los eventos de recombinación parecen haber tenido un papel relevante en la evolución de estas secuencias. Por tanto, este tipo de procesos podrían incrementar las estimaciones [erróneamente] de las tasas de sustitución nucleotídica sinónima, y por tanto afectar a nuestras estimas de divergencia. Este hecho podría explicar porqué nuestras estimas de divergencia entre las cepas B puras y aquellas detectadas en la zona híbrida, son mayores que entre las cepas detectadas en poblaciones puras más distantes geográficamente. Nuestro reloj molecular no estaría calibrado y el incremento de las tasas podría ser un artefacto inducido por los procesos de recombinación asociados a la evolución de estas secuencias (Klasson *et al.*, 2009).

Independientemente de este artefacto, las tasas de divergencia entre las cepas pertenecientes al complejo Cp\_ST2 (supergrupo B) y detectadas en poblaciones tan distantes como Alpes, Sistema Central o Inglaterra, nos indican un origen de la infección mucho más reciente.

#### **34.14.5 Transmisión horizontal vs. introgresión.**

Ambas hipótesis podrían en principio explicar la actual distribución de las cepas bacterianas adscritas al supergrupo B en *C. parallelus*. Sin embargo existen varios matices que pueden ayudarnos a realizar una reconstrucción más exacta del origen de la infección. El principal obstáculo para su transmisión por introgresión es el actual aislamiento de las poblaciones, sin embargo esto podría no haber sido así en el pasado, de modo que las poblaciones pirenaicas habrían estado en contacto con aquellas ubicadas en el Sistema Central.

El patrón de infección por B detectado en *C. parallelus* no parece corresponderse con las expansiones territoriales de esta especie tras la glaciación. De hecho, son las poblaciones del norte de Europa las que presentan índices más altos de infección, disminuyendo progresivamente según avanzamos hacia el sur. La presencia de las mismas cepas bacterianas en poblaciones tan distantes apoyaría una expansión rápida de la infección.

Una transmisión horizontal reciente debería asociarse a un *sweep selectivo*, pudiéndose relacionar probablemente una determinada cepa bacteriana (en nuestro caso, la cepa B) con determinados haplotipos mitocondriales, dada la transmisión materna de *Wolbachia*. Este efecto se ha observado y ha sido discutido en varios modelos experimentales, tanto en la naturaleza, como en condiciones de laboratorio, de modo que la nueva infección por *Wolbachia* viene asociada a una sustitución de los haplotipos mitocondriales previamente existentes en la población, por aquellos que quedan asociados a la bacteria tras la infección (Turelli & Hoffmann, 1991; Ballard *et al.*, 1996; Jiggins, 2003; Gompert *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Slothouber Galbreath *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011).

En nuestro caso, los estudios de Lunt *et al.* (1998) muestran una elevada variabilidad de haplotipos mitocondriales en *C. parallelus*. Estos haplotipos aparecen en distintas poblaciones europeas y salvo casos concretos, con polimorfismo en las poblaciones. Este escenario podría apoyar eventos de transmisión horizontal muy recientes, en los que la infección no se ha fijado en las poblaciones y por tanto, el polimorfismo (infección/no infección) se mantenga. Este escenario es coherente con las tasas intermedias de infección observadas en estas poblaciones. A su vez, esta hipótesis se apoya en la detección de cepas muy cercanas de este supergrupo en especies de ortópteros que comparten hábitat con *C. parallelus*. Por otra parte, los datos obtenidos a partir de la caracterización de las cepas adscritas al supergrupo B y detectados en poblaciones híbridas, nos muestran que la infección por el supergrupo B tuvo que llegar a la zona híbrida durante su formación. Esto implica que la expansión de la infección debió producirse al menos hace 9.000 años (Hewitt, 1993).

A su vez, si la capacidad de transmitirse horizontalmente de esta bacteria es tan alta, tal y como apoyan algunos de nuestros datos, así como otros datos experimentales (como la rápida expansión de *Wolbachia* en California (Turelli & Hoffmann, 1991)) un obstáculo es explicar porqué la propagación del supergrupo B se ha detenido aparentemente, y no ha prosperado en poblaciones más al sur de la Península Ibérica. La existencia de una infección previa por el supergrupo F, y (quizás) las características ecológicas de estas poblaciones, pudieron motivar que la nueva infección no prosperara. La variación intrageneracional observada en las poblaciones del centro de la Península, bien asociada a condicionantes ambientales, o a otros aspectos desconocidos, puede ser un buen indicio (como nos muestran los modelos realizados en el marco de esta Tesis).

Un mecanismo alternativo a la transmisión horizontal sería la introgresión de *Wolbachia* tras la hibridación entre dos especies de hospedadores y la inducción de incompatibilidad citoplasmática. Esta posibilidad se apoya en la existencia en el Sistema Central de determinados

alelos bacterianos presentes en la zona híbrida pirenaica (alelo H2 del gen *coxA*). En este caso podríamos haber observado la introgresión de los haplotipos mitocondriales asociados.

Los estudios de Lunt *et al.*, (1998) muestran la introgresión de haplotipos propios del Pirineo francés en poblaciones tales como Escarrilla. Los autores propusieron entonces como explicación la posible existencia de clinas muy anchas asociadas a los marcadores neutrales, entre ellos los marcadores mitocondriales (Lunt *et al.*, 1998). Se apoyaron en datos previos que incidían en la no coincidencia entre las clinas estudiadas para distintos caracteres (Butlin *et al.*, 1991; Ferris *et al.*, 1993; Hewitt, 1993; Neems & Butlin, 1993). Incluso se plantearon si quizás alguna fuerza selectiva favoreciera la introgresión de este marcador, aparentemente neutro.

Pese a que estos datos apoyan la hipótesis de la introgresión del supergrupo B (en contraposición a su supuesta transmisión horizontal reciente), los datos del Sistema Central contradicen esta posibilidad. En estas poblaciones pueden observarse 2 mitotipos: el mitotipo 9, caracterizado únicamente en la Península Ibérica (Sistema Central y norte de España), y el mitotipo 1, presente también en poblaciones francesas, del norte peninsular, e incluso Turquía, y que puede ser interpretado como haplotipo ancestral. Sin embargo no se han detectado en la Península ejemplos de los restantes haplotipos europeos (33 en total), y que se habían detectado en Escarrilla. Esto dificulta plantear un escenario en el que el supergrupo B hubiera introgresado hasta estas poblaciones centrales o del sur, tras el contacto de las dos subespecies de saltamontes en la zona híbrida. A su vez, no se observa una introgresión de las cepas del Cp\_ST11 (supergrupo F: detectado principalmente en las poblaciones europeas no ibéricas, así como en la cornisa cantábrica), en las poblaciones del sur del Pirineo.

La extrapolación a la zona híbrida de los modelos matemáticos presentados por Hilgenboecker *et al.* (2009) sugiere que la interacción entre la incompatibilidad citoplasmática y las incompatibilidades nucleares entre subespecies, permitiría sin embargo la introgresión limitada de ciertos marcadores citoplasmáticos de Cpp en Cpe. Esto podría explicar la aparición de estos haplotipos mitocondriales en Escarrilla, pero no en poblaciones más distantes de la zona de contacto (Lunt *et al.*, 1998).

Combinados estos datos, consideramos que la infección por el supergrupo B fue independiente a la del supergrupo F, siendo posible que se extendiera por Europa mediante transmisión horizontal. Si bien, el que la infección por el supergrupo B no esté fijada en estas poblaciones, hace que no se haya producido el típico *sweep selectivo* caracterizado en otras especies. Por otra parte, el actual patrón de infección, hace difícil respaldar la hipótesis de que tras su llegada al Pirineo, la infección se expandiera en la Península Ibérica mediante introgresión, tras la hibridación entre Cpe y Cpp.

#### 34.14.6 Visión general del origen de la infección.

Independientemente de los mecanismos que hayan podido permitir el establecimiento de *Wolbachia*, si asumimos que la infección por el supergrupo F, como muestran los datos, estaba presente durante la formación de la zona híbrida, y que el supergrupo B infectó *a posteriori* las poblaciones, el escenario propuesto sería el siguiente (Fig. 83):

- (i) Tras la retirada de los hielos, serían las poblaciones del centro de la Península las que colonizarían los Pirineos, encontrándose con los *C.p. parallelus* procedentes de los Balcanes, como proponen estudios previos (Lunt *et al.*, 1998). Las diferencias acumuladas durante la divergencia, junto con los fenómenos de IC unidireccional (y bidireccional, ver (ii)) entre los distintos complejos ST existentes, influirían en la formación de la actual zona híbrida, junto con otras incompatibilidades nucleares generadas durante el aislamiento en alopatria de las poblaciones del hospedador.
- (ii) La infección por el supergrupo B, podría producirse posteriormente a la adquisición de la cepa F, como consecuencia de una expansión rápida de la infección, aunque los datos indican que ya estaba presente durante la formación de la zona híbrida. Esta hipótesis se apoyaría en la homogeneidad de cepas localizadas en poblaciones muy distantes, así como en las estimas de divergencia entre las cepas detectadas en la zona híbrida y el resto de Europa. En relación a este hecho cabe destacar los estudios realizados en California (Turelli & Hoffmann, 1991), describiendo la expansión de la infección por *Wolbachia* en *Drosophila* sp. en apenas 5 años (considerando generaciones de aproximadamente 15 días, unas 120 generaciones). De hecho el que en las poblaciones de Bubión (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010) y Norte de Inglaterra prácticamente no se ha detectado la infección por supergrupo B, o su frecuencias sea muy limitada, podría a su vez apoyar la hipótesis de una expansión reciente de la infección procedente de Europa: el aislamiento de estas poblaciones y su situación geográfica no habrían permitido aún el establecimiento de la infección.
- (iii) Tras la infección, procesos de recombinación asociados a la zona híbrida darían lugar a las distintas cepas recombinantes.

#### 34.15 Importancia de la existencia de varios supergrupos de *Wolbachia* (F y B), infectando a *C. parallelus*. IC unidireccional y bidireccional.

Los estudios filogenéticos llevados a cabo en este estudio confirman que *C. parallelus* se encuentra infectado por los supergrupos B y F de *Wolbachia*. Existen diferencias importantes entre las cepas que infectan las distintas poblaciones analizadas. La distribución de éstas no es aleatoria, sino que está relacionada con la localización geográfica de estas poblaciones del hospedador (de Fig. 50 a Fig. 56).

Nuestros datos son consistentes con los patrones de infección caracterizados en estudios previos y apoyan un escenario en el que *Wolbachia* provoca IC unidireccional y bidireccional entre individuos infectados y no infectados, así como entre individuos con distinta infección. La intensidad de esta alteración reproductiva se ha cuantificado como  $H_{UNI}=0.67$ ,  $H_{BI}=0.83$  (Zabal-Aguirre, com. pers; Bella *et al.*, 2010).

Experimentos anteriores a la detección de la infección describían la existencia de homogamia asimétrica en cruzamientos secuenciales de machos puros Cpe y Cpp con hembras de cada una de las subespecies. Se observó un mayor número de descendientes puros en los cruzamientos con hembras Cpp, mientras que la proporción de descendientes puros e híbridos fue la misma en los cruzamientos con hembras Cpe (Bella *et al.*, 1992). Esto podría explicarse como consecuencia de la IC unidireccional provocada por *Wolbachia*, debido a que los cruzamientos que darían lugar a descendientes híbridos entre hembras Cpp (potencialmente no infectadas debido a la presumible baja tasas de infección de la población de donde procedían, Lac de Fabreges, 10km al norte del puerto de Portalet) y machos Cpe (potencialmente infectados debido a las altas tasas de infección detectadas en la zona donde fueron capturados, a 6km al sur del puerto de Portalet), serían parcialmente incompatibles.

Generalizando a los patrones de infección descritos en la zona híbrida (el “Patrón del norte”, con bajas tasas de infección y los Patrones “de Sallent” y “del sur”, con altas tasas de infección), y asumiendo la existencia de la IC unidireccional descrita ya en el momento en el que tuvo lugar el contacto secundario “original” que dio lugar a la zona híbrida, determinados cruzamientos de individuos Cpe (presumiblemente infectados) con individuos Cpp (presumiblemente no infectados), sufrirían de forma recurrente una reducción en el número de descendientes (ver figura 82). Esto habría provocado que la tasa de individuos migrantes que se reproducen y dejan descendencia fértil en la población de destino, se viera reducida (ver más adelante) (Telschow *et al.*, 2002a). En las sucesivas generaciones observamos que determinados cruzamientos entre individuos híbridos y los parentales de ambas subespecies, pueden sufrir una reducción en el número de descendientes como consecuencia de los distintos niveles de infección (a su vez, sufrirían otro tipo de incompatibilidades genómicas (ver siguiente sección) fruto de la divergencia de ambas subespecies en alopatría). Ambos efectos contribuirían de

forma conjunta a la formación de la zona híbrida tal y como la observamos actualmente.

Una de las principales críticas al papel que la IC unidireccional puede tener en la divergencia de las poblaciones es que esta disminución en el flujo genético sólo ocurre en una dirección (de las poblaciones infectadas a las no infectadas). Sin embargo, eso supone una sobresimplificación del proceso. Telschow *et al.* (2002a) demostraron matemáticamente que el efecto de la IC unidireccional se manifestaba en una disminución asimétrica del flujo génico. De este modo, se observa que el flujo génico de una población no infectada ( $\approx C_{pp}$ ) a una población infectada ( $\approx C_{pe}$ ) se vería reducido en  $m/(1+(1-H))$ , mientras que entre una población infectada ( $\approx C_{pe}$ ) a una población no infectada ( $\approx C_{pp}$ ), se vería reducido en  $m(1-(1-H))$ , siendo  $m$  la tasa de migración, lo que resulta en una mayor reducción del flujo genético de las poblaciones más infectadas ( $\approx C_{pe}$ ), a las menos infectadas ( $\approx C_{pp}$ ).

Esta estima del flujo génico asume que la infección está totalmente fijada en una población, y es inexistente en la otra. Obviamente esto no es así en la zona híbrida de *C. parallelus*, por lo que esta reducción sería menor. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el efecto de este endosimbionte es una incompatibilidad añadida a las genómicas ya existentes en los saltamontes (originadas en alopatría), y su papel en la formación y mantenimiento de la zona híbrida debe ser interpretado como tal. Este escenario, en el que la IC induciría una mayor reducción en el flujo genético de  $C_{pe}$  a  $C_{pp}$ , estaría respaldado por el desplazamiento de varias clinas hacia  $C_{pe}$  a lo largo de la zona híbrida (Shuker *et al.*, 2005a). Este factor, combinado con las incompatibilidades genéticas conocidas entre ambas subespecies, supone una barrera adicional al flujo génico entre ambas subespecies, y a su vez, entre las poblaciones híbridas y las poblaciones puras en ambos extremos.

El análisis de las distintas incompatibilidades existentes entre las poblaciones se complica al estar infectado *C. parallelus* por varios supergrupos de *Wolbachia*: La caracterización de las frecuencias de infección por los dos supergrupos detectados indica que, mientras en las poblaciones pertenecientes al “Patrón del sur” (constituido por poblaciones puras de  $C_{pe}$ ) el supergrupo mayoritario es el F, junto a tasas variables de coinfección, las poblaciones pertenecientes al “Patrón del norte” (entre las que se incluyen las poblaciones puras de  $C_{pp}$ ) presentan niveles muy bajos de infección, siendo ésta mayoritariamente causada por el supergrupo B. Por tanto, junto a la reducción en el flujo génico debido a la IC unidireccional, actúa la IC bidireccional, por existir dos tipos distintos de individuos infectados.

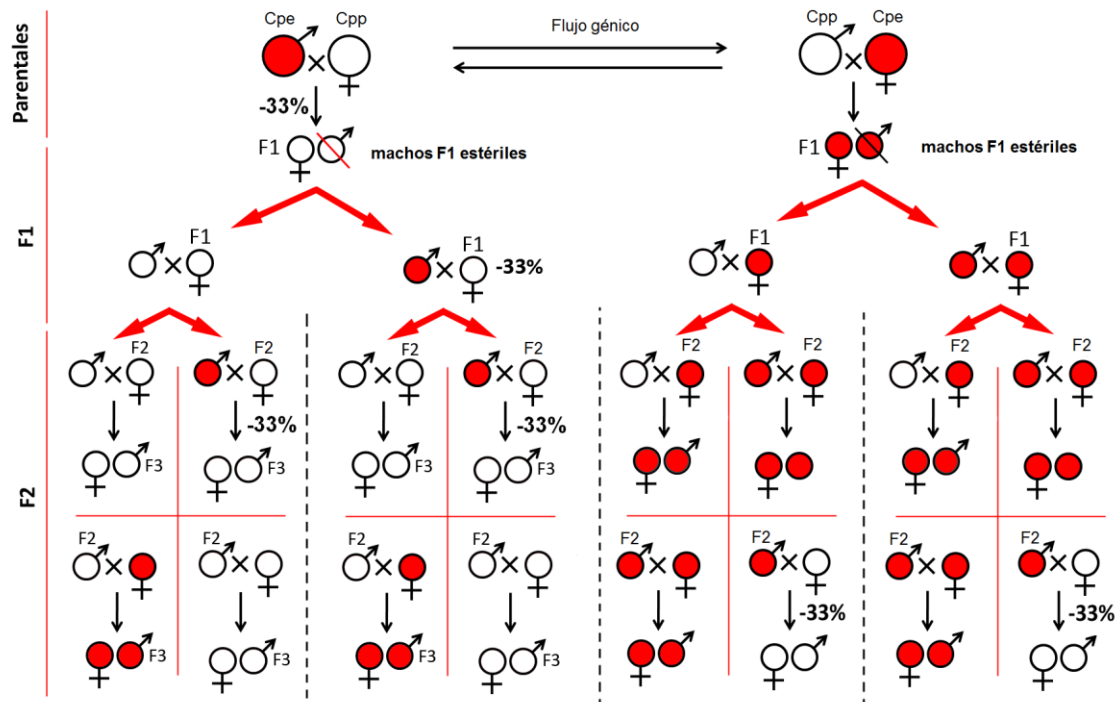


Fig. 84: Esquema mostrando las incompatibilidades unidireccionales teóricamente generadas durante las primeras generaciones tras el contacto "original" entre ambas subespecies (modelo simplificado), asumiendo el  $H=0,67$  estimado por Zabala-Aguirre (com. pers.) y Bella *et al.* (2010). En la figura se representan los posibles cruces entre parentales, así como los sucesivos cruces entre la F1, así como entre la F2. En el modelo asumimos que *Cpe* está infectado por *Wolbachia* y *Cpp* no lo está. Los círculos rojos indican que el individuo está infectado por *Wolbachia*, mientras que los blancos, indican un individuo que no está infectado. En función de que los parentales pertenezcan a una u otra subespecie, la posibilidad real de estar o no infectado diferirá, por lo que no todos los cruzamientos serán igual de probables. Nótese una reducción reiterada en el número de descendientes entre determinados cruzamientos.

La capacidad de *Wolbachia* para generar una barrera real entre poblaciones infectadas y no infectadas sin embargo depende de la capacidad de que el polimorfismo (individuos no infectados, frente a individuos infectados, o en su caso poblaciones infectadas por distintas cepas bacterianas), se mantenga en el tiempo. Si la población no infectada se infecta por esta bacteria, no existirá tal barrera. Las condiciones para la progresión de la infección en una población no infectada han sido descritas por múltiples modelos (Hoffmann *et al.*, 1990; Turelli, 1994; Turelli, 2010). Aparentemente las predicciones apuntan a que la infección prosperaría en las poblaciones no infectadas y por tanto acabaría por no representar una barrera al flujo genético; sin embargo los estudios de Telschow *et al.* (2005b) y Flor *et al.* (2007) proponen que este polimorfismo podría mantenerse en poblaciones estructuradas.

En el caso de *C. parallelus* las frecuencias de infección parecen ser estables a lo largo del tiempo. La variación inter-anual es puntual, y en general las poblaciones se mantienen en torno a unos mismos valores de infección. Las simulaciones matemáticas llevadas a cabo en

colaboración con Rafael Granero-Belinchón (ICMAT), nos han permitido observar que, en general, deberíamos esperar que las frecuencias actuales de cada población (sin considerar la migración entre ellas) se mantengan en el tiempo. Estos estudios son aun preliminares y deben ser ampliados para darnos una visión de conjunto de la dinámica de la infección. A su vez, existe una estructura clara de la infección por *Wolbachia* en ambos lados de la zona híbrida, lo que demuestra que, si estamos en lo cierto y las infecciones ya estaban presentes en su origen, este polimorfismo entre individuos infectados y no infectados, y a su vez, infectados por distintos cepas de *Wolbachia* se ha mantenido tras aproximadamente 9000 generaciones (Hewitt, 1993). Esto apoyaría la dinámica propuesta por Telschow *et al.* (2005b) y Flor *et al.* (2007).

En un primer momento de la zona híbrida, se produciría la IC entre las poblaciones de *C. parallelus erythropus* (infectadas) y las poblaciones de *C. parallelus parallelus* (no infectadas) sugerida por la Fig. 84. El mantenimiento del polimorfismo (y por tanto la incompatibilidad generada por *Wolbachia*) en la infección dependería de la tasa efectiva de migración entre ambas subespecies, entrando también en juego las incompatibilidades genómicas, etológicas así como diversos procesos microevolutivos como la deriva, etc. Flor *et al.* (2007) estimaron que esta tasa de migración no debía sobrepasar un 4% para permitir el mantenimiento del polimorfismo (infección/no infección). A su vez, si consideramos la IC bidireccional, esta tasa, siguiendo las estimas de Telschow *et al.* (2005b), y considerando un  $H_{BI}=0,83$  (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010) rondaría el 14%. Hay que tener en cuenta que estas estimas asumen la fijación de la infección en las poblaciones, por lo que para mantenerse esta situación en *C. parallelus*, como muestran los datos experimentales, la tasa de migración debe ser mucho menor. A su vez, habría que tener en cuenta el posible papel de otros elementos, como la endogamia dentro de las poblaciones (Branca *et al.*, 2009), así como las características demográficas de la zona híbrida que pueden condicionar las tasas de migración entre poblaciones, limitando la capacidad de la infección para extenderse.

Lo que se desprende de estos estudios teóricos es, sin duda, que aunque la IC bidireccional en sí misma es un mecanismo más robusto y más efectivo, sin embargo, bajo determinadas condiciones, la IC unidireccional puede ser una barrera al flujo génico considerable. De hecho, cabe destacar el papel que algunos autores han dado a la IC unidireccional a la hora de explicar la divergencia de *Tribolium confusum* (Wade & Chang, 1995) o *Drosophila sp.* (Shoemaker *et al.*, 1999)

Por otro lado, debemos tener en cuenta que la IC actúa en la F1 (Bordenstein *et al.*, 2003). Esto supone, como ratifican Telschow *et al.* (2005b) la importancia potencial que la IC puede tener durante el contacto entre dos poblaciones que hayan divergido en alopatria.



### 34.16 Interacción entre las incompatibilidades genómicas y aquellas inducidas por *Wolbachia*.

Hilgenboecker *et al.* (2009) describen la importancia de considerar la interacción entre las incompatibilidades genómicas y aquellas inducidas por *Wolbachia* a la hora de entender el papel conjunto de ambos factores en el proceso de especiación. Estos autores consideran como base el modelo de Dobzhansky-Muller (DM) (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1934; Muller, 1939), introduciendo el efecto de la incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia* (ver introducción, sección “Modelo de Dobzhansky-Muller”, pág. 15).

Telschow *et al.* (2002b) comprobaron que la tasa máxima de migración efectiva en el modelo DM era equivalente a la tasa máxima para los modelos que únicamente incorporaban IC bidireccional, por lo que se deducía que la reducción en el flujo génico que induciría *Wolbachia*, es equivalente a las incompatibilidades genómicas en el DM.

Hilgenboecker *et al.*, (2009) modificaron el modelo de DM, incluyendo la infección diferencial por *Wolbachia* durante la divergencia de las dos poblaciones en alopatria (IC bidireccional). El modelo también incluía la posibilidad de que una población fuese infectada por la bacteria, mientras que la otra permaneciese no infectada (IC unidireccional). Tras el contacto secundario, se expresarían ambas incompatibilidades citoplasmáticas (uni o bidireccional) conjuntamente con las genómicas. Este escenario sería muy similar al que se produciría en *C. parallelus* durante el contacto secundario entre ambas subespecies tras la última glaciación.

El estudio de Hilgenboecker *et al.* (2009) demuestra que la infección por *Wolbachia* en combinación con la selección adaptativa de las especies parentales, y las incompatibilidades nucleares, modifica la dinámica del modelo DM, de modo que:

- (i) En ausencia de selección adaptativa de las especies parentales frente a los híbridos, la presencia de IC bidireccional retrasa la desaparición de los alelos que causan las incompatibilidades nucleares. Incluso valores de  $H=0,50$ , permiten retrasar de 274 a 760 generaciones el tiempo necesario para la homogeneización de las poblaciones. El número de generaciones se incrementa a 5064 generaciones en el caso de una  $H=0,10$ . Esto implica mayor tiempo para que puedan desarrollarse otro tipo de incompatibilidades, así como la actuación de mecanismos tales como el *reinforcement* (ver más adelante).
- (ii) En presencia de selección adaptativa de los parentales, la inclusión de IC bidireccional en el modelo permite que se mantengan ambas poblaciones parentales (no hay

homogeneización) incluso con valores altos de migración. Este efecto se produce incluso con niveles de  $H=0,80/0,90$  y se acentúa si se incrementan los niveles de incompatibilidad (por ejemplo, para un  $H=0,20$  la tasa de migración efectiva sería de un 8,9% frente a un 1,3% en ausencia de *Wolbachia*).

Por su parte, se analizó el efecto de la incompatibilidad unidireccional interaccionando con las incompatibilidades nucleares.

En los casos en los que se simula la migración desde una población no infectada hacia una subpoblación infectada, se observa que la IC puede estabilizar las incompatibilidades nucleares, incrementando las tasas de migración que evitarían la homogeneización de las poblaciones parentales. En los casos en los que la población principal está infectada, y sus migrantes se dirigen a una subpoblación no infectada, son las incompatibilidades nucleares las que evitan que la segunda población se infecte, y por tanto, esta interacción permite que la IC unidireccional actúe como barrera adicional. Hablamos pues de una efecto sinérgico entre ambas fuerzas (Hilgenboecker *et al.*, 2009).

Estos datos nos permiten sugerir el papel de *Wolbachia* en la zona híbrida de *C. parallelus*, en la cual, IC unidireccional y bidireccional actuarían simultáneamente, y en sinergia con las incompatibilidades nucleares acumuladas como consecuencia de la divergencia en alopatría de ambas subespecies parentales.

#### **34.17 La regla de Haldane: Incompatibilidades nucleares en *C. parallelus* y su interacción con *Wolbachia*.**

Estudios previos comprobaron una reducción en el desarrollo testicular de los machos híbridos F1 en relación a sus progenitores puros, así como múltiples problemas en la meiosis que se traducían en esterilidad (Hewitt *et al.*, 1987; Bella *et al.*, 1990; Virdee & Hewitt, 1992). Este efecto no se observaba en las hembras, que eran fértiles. Esta observación cumplía con la regla de Haldane. A su vez, Virdee & Hewitt (1992) observaron que estas deficiencias se correspondían con la longitud y desarrollo de los folículos, al menos en la muestra considerada, y podían estar relacionadas bien con un efecto materno, bien con el comportamiento disruptivo del cromosoma X de Cpp. Por otra parte, los cruzamientos entre las hembras fértiles F1, y ambas subespecies revelaron datos interesantes:

- (i) El fenotipo mostrado por los machos F2 era intermedio.



- (ii) La disfunción testicular parecía explicarse por la incompatibilidad entre el cromosoma X propio de Cpp, y el *background* citoplasmático, de tal forma que la disfunción testicular era menor en aquellos individuos cuyo citoplasma y cromosoma X provinieran de una misma subespecie. A su vez, aquellos híbridos cuyo genoma estaba formado por  $\frac{3}{4}$  partes de autosomas procedentes de Cpe, presentaban menos disfunción testicular que aquellos que tenían  $\frac{3}{4}$  partes de sus autosomas procedentes de Cpp, lo que se puede interpretar a nuestro entender como la aparición de epistasis negativas entre *loci* autosómicos.
- (iii) En relación a la tasa de eclosión en los distintos retrocruzamientos, se observó que dicha tasa variaba en función del origen del citoplasma de los individuos F1. Cabe destacar que el orden de los cruzamientos en función de esta tasa de eclosión (ver figura 83) era [utilizando la nomenclatura “descendencia de (hembra x macho)” x macho parental]: (CpexCpp)xCpp > (CpexCpp)xCpe > (CppxCpe)xCpe > (CppxCpe)xCpp. Estos datos sugerían la posibilidad de que algún factor citoplasmático condicionara estas tasas. Los cruzamientos tipo (CppxCpe)xCpe (hembra F1 resultante de un cruzamiento entre una hembra Cpp, y un macho Cpe, cruzada con un macho Cpe) presentaban una tasa de eclosión menor que los cruzamientos (CpexCpp)xCpp o (CpexCpp)xCpe. Esto respalda la posibilidad de que los primeros se vieses sometidos a IC. Sin embargo los datos no concuerdan en el caso de los cruzamientos (CppxCpe)xCpp, con la menor tasa de eclosión, dado que estos raramente se verían sometidos a IC dados nuestros resultados actuales. Hay recordar que los datos eran escasos y las diferencias sólo se observaban a  $p < 0,001$ , por lo que las discrepancias entre los cruzamientos (CppxCpe)xCpe > (CppxCpe)xCpp deben tomarse con precaución (Fig. 85).

Una de las explicaciones para la aparición de incompatibilidades que siguieran la regla de Haldane, son las epistasis entre el cromosoma X y el set de autosomas presentes en los organismos F1, que en este caso se tamponaría en presencia de otro cromosoma X, como demuestra la viabilidad y fertilidad de las hembras F1. En la F1 podrían a su vez existir incompatibilidades mediadas por el citoplasma. De nuevo, en la siguiente generación, F2, aparecerían otro tipo de incompatibilidades que podrían estar relacionadas con la interacción entre el cromosoma X de Cpp y el citoplasma de Cpe (Virdee & Hewitt, 1992). Debido a esto se contempla la posibilidad de que en cada tipo de cruzamiento estuviesen actuando interacciones genómicas distintas, que incluyesen tanto incompatibilidades autosoma-autosoma, como X-autosoma y X-citoplasma (Fig. 85 y Fig. 86).

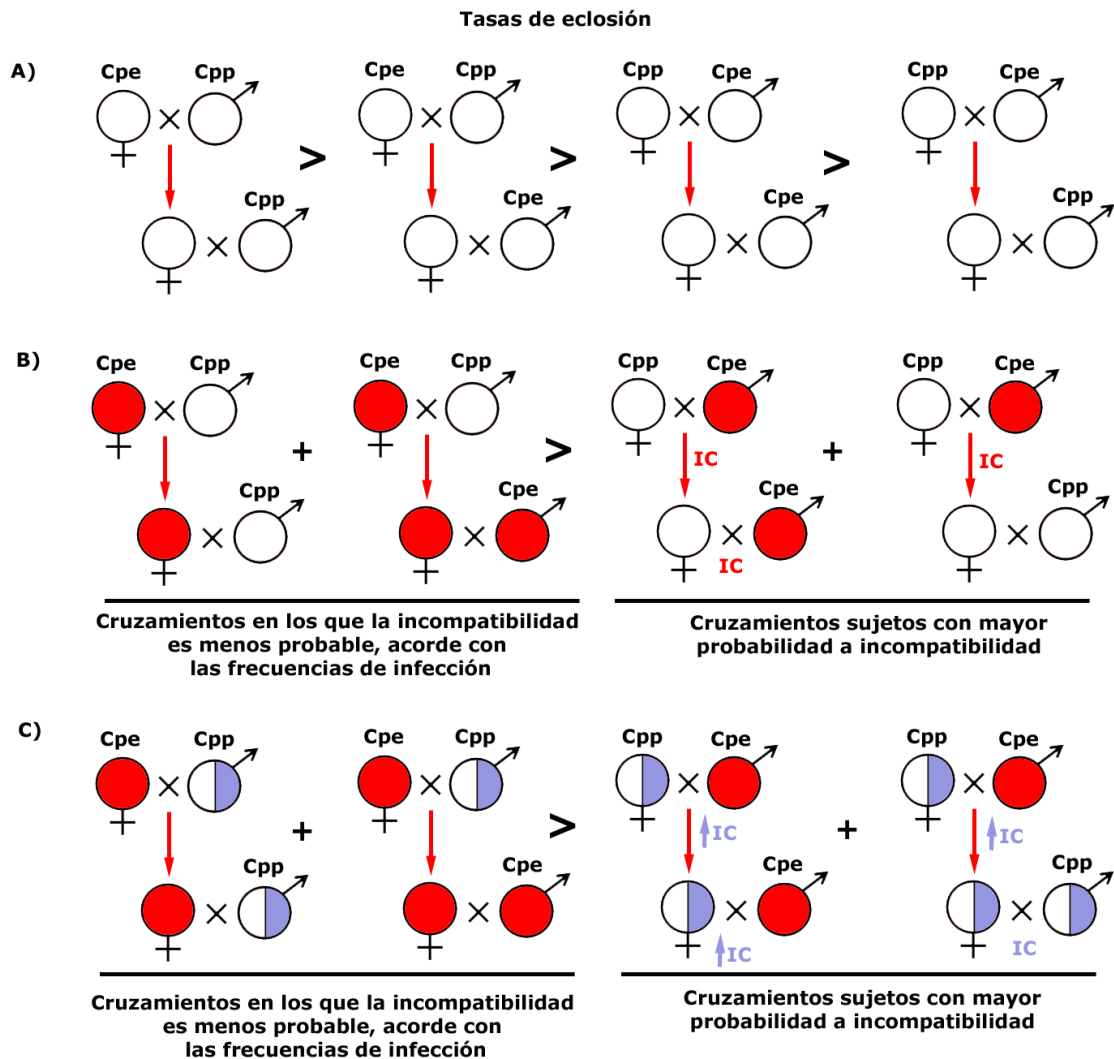


Fig. 85: a) Comparación de los resultados obtenidos por Virdee & Hewitt (1992) en relación a las tasas de eclosión obtenidas tras los distintos cruzamientos, con los resultados esperados asumiendo b) Incompatibilidad citoplasmática unidireccional y c) Incompatibilidad citoplasmática bidireccional. En b) Los círculos rojos indican que el individuo está infectado por *Wolbachia*, mientras que los blancos indican un individuo no infectado. En c) los círculos rojos indican un individuo infectado por la cepa F de *Wolbachia*, y los círculos parcialmente en azul representan individuos infectados por el supergrupo B. Nótese las diferencias en las frecuencias de infección por ambos supergrupos a lo largo de la zona híbrida, por ejemplo, los niveles bajos de infección por B en gran parte de las poblaciones, lo que condicionará la probabilidad de cada uno de los cruzamientos, y por tanto, la probabilidad de que se produzca incompatibilidad en cada uno de los casos posibles.

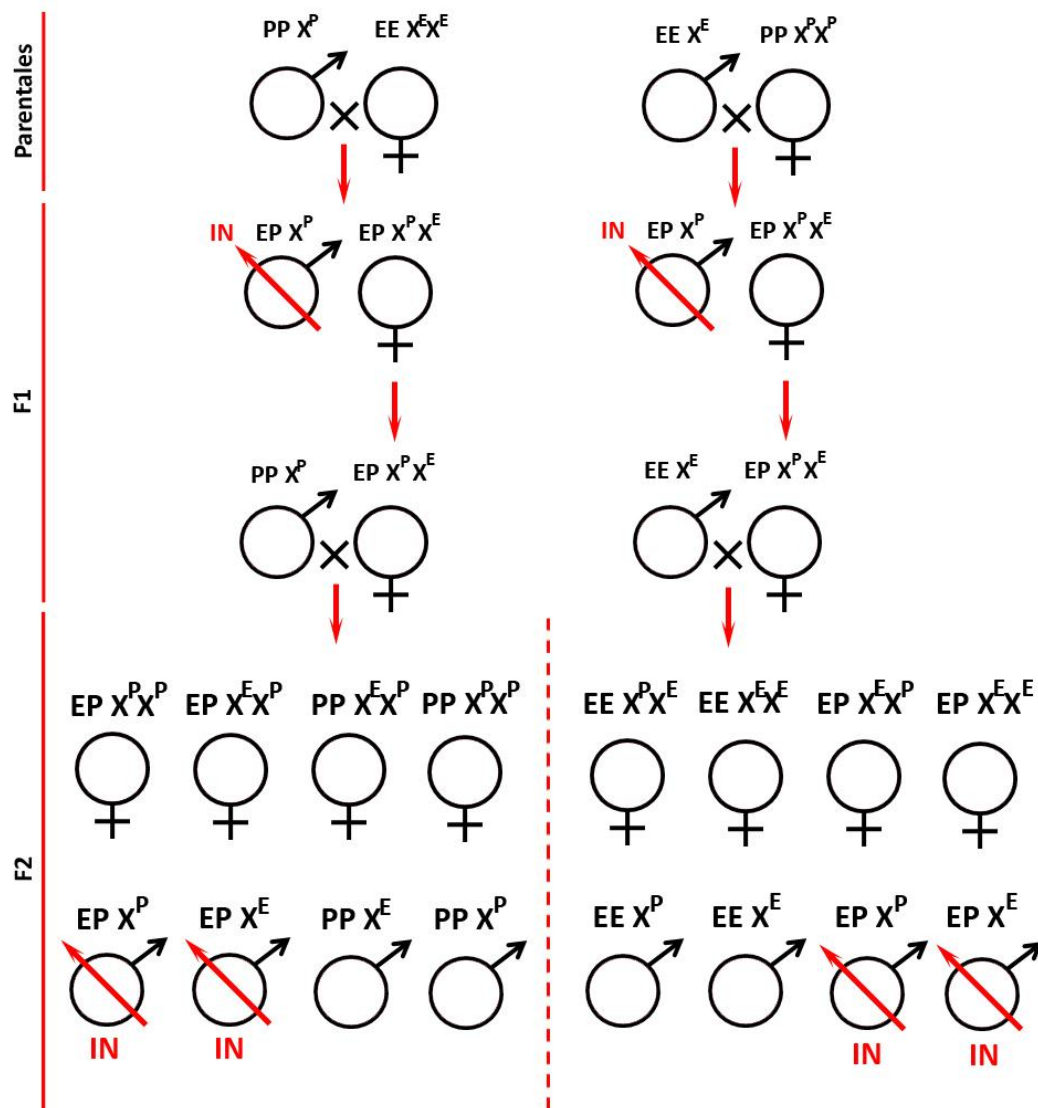


Fig. 86: Esquema que representa las combinaciones genéticas establecidas en los cruzamientos entre parentales, así como en los posteriores retrocruzamientos de las hembras F1 con ambos parentales. Las incompatibilidades nucleares (IN) tienen por resultado la esterilidad de los machos F1 y, parcialmente, de los machos F2. P y E representan los autosomas propios de los parentales Cpp y Cpe, respectivamente.  $X^P$  y  $X^E$  representan a los cromosomas X característicos de cada una de las subespecies. Téngase en cuenta que i) durante la meiosis de las hembras F1, se producirá la recombinación de ambos tipos de cromosomas X. ii) Tras la F1, se producirá recombinación entre los autosomas característicos de cada subespecie. Esto provocará que la denominación de P, E,  $X^P$  y  $X^E$  en sucesivas generaciones no sea estricta, existiendo múltiples combinaciones posibles. Por otro lado, debemos tener en cuenta que este escenario representa una simplificación de la zona híbrida, debido a que tras 9000 generaciones desde este contacto inicial, actualmente no se producirían cruzamientos entre individuos puros, sino entre las distintas variantes existentes actualmente en las poblaciones híbridas. Finalmente, hay que tener en cuenta que en este escenario no se recogen las incompatibilidades citoplasmáticas inducidas por *Wolbachia*.

A la vista de estos resultados, la naturaleza de las incompatibilidades genómicas actuando en los híbridos de *C. parallelus* es presumiblemente compleja y multi-locus. Es por ello que el modelo de DM modificado expuesto previamente sea una simplificación de la realidad y deban considerarse otro tipo de interacciones, concretamente las incompatibilidades expresadas únicamente en los híbridos de sexo heterogamético, siguiendo la regla de Haldane.

Hilgenboecker *et al.* (2009) contemplaron en sus simulaciones el efecto de este tipo de incompatibilidades en la homogeneización de las poblaciones. Para ello ensayaron varios escenarios y tipos de determinación sexual. En nuestro caso nos referiremos a los resultados de las simulaciones que consideraban (Fig. 87).

- (i) Que los machos eran el sexo heterogamético.
- (ii) Que se establecía la incompatibilidad entre X (por ejemplo el cromosoma X de Cpp) y A (locus derivado que podría aparecer en Cpe), sin que esto suponga que este escenario es exactamente el mismo que encontramos en *C. parallelus* (ver más adelante).
- (iii) Que la infección por *Wolbachia* iba asociada a los individuos AAXX/AAX0. Este escenario es similar al de *C. parallelus* con ciertas salvedades, por ejemplo respecto al tipo de incompatibilidades generadas en los machos F1.

Sus resultados mostraban que en ausencia de selección, este tipo de incompatibilidades actuando de forma individual no permitirían el mantenimiento de la zona híbrida, debido a que las hembras F1 eran totalmente fértiles, como efectivamente son las hembras F1 de *C. parallelus*. La selección para los alelos derivados favorecía el mantenimiento de la zona híbrida, pero la tasa de migración máxima para evitar la homogeneización era muy baja (en torno al 1.7%).

Por su parte, la interacción con *Wolbachia* permitía la estabilización de esta barrera nuclear. En el modelo de islas propuesto por los autores (en los que existe una población principal infectada, y una isla no infectada hacia donde migran los individuos procedentes de la población principal), la IC permite que se mantenga el polimorfismo respecto a la infección/no infección y estabilizar la divergencia genética entre ambas poblaciones. La IC refuerza el efecto de las incompatibilidades nucleares dado que permite que esta incompatibilidad afecte a ambos sexos (esto es, dando lugar a una reducción de la descendencia, tanto machos como hembras, en los cruzamientos incompatibles a nivel de IC), frente a las incompatibilidades nucleares (IN) que sólo afectaban a los machos. Este efecto de estabilización era especialmente notable en los casos en los que la IN no era muy altas (Hilgenboecker *et al.*, 2009).

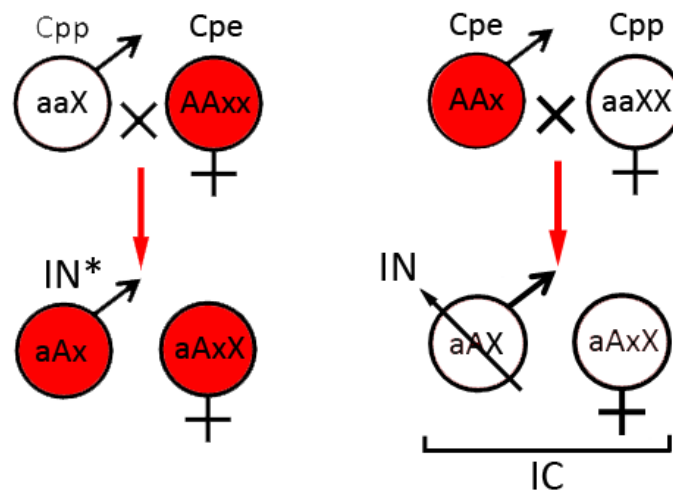


Fig. 87: Esquema mostrando las incompatibilidades entre los alelos A y X en el modelo propuesto por Hilgenboecker *et al.* (2009), por el cual se inducen incompatibilidades nucleares (IN). En dicho modelo las incompatibilidades se producen entre el cromosoma "X" y el autosoma "A". Estas incompatibilidades actuarían conjuntamente con las incompatibilidades citoplasmáticas (IC) generadas por la presencia o no de infección por *Wolbachia*. Los círculos rojos indican que el individuo está infectado por *Wolbachia*, mientras que los blancos, indican un individuo no infectado. Aplicado a *C. parallelus* sabemos que las incompatibilidades nucleares existentes, suponen la infertilidad de los machos F1 en ambos cruzamientos, independientemente de su causa. El fondo rojo indica infección por este endosimbionte bacteriano.

Estos resultados son especialmente relevantes en el caso de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*, debido al tipo de incompatibilidades descritas entre ambas subespecies de saltamontes. La existencia de IC (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010) junto con la actual caracterización de sus frecuencias de infección a ambos lados de la zona híbrida, las distintas cepas implicadas y la datación del origen de la infección de *C. parallelus* por los distintos supergrupos, permiten contemplar que *Wolbachia* esté afectando decisivamente en la actual dinámica de la zona híbrida, así como en su formación.

### 34.18 Posible interacción entre factores citoplasmáticos asociados a la infección por *Wolbachia* y el cromosoma X de Cpp.

Hay que destacar el papel que pueden tener en la zona híbrida factores demográficos. En concreto, Zabal-Aguirre *et al.* (2010) hicieron hincapié en el papel que podían tener éstos en esta dinámica de la población de Sallent de Gállego, que presentaba frecuencias de coinfección muy elevadas (y que se encontraba en la intersección entre poblaciones con altas tasas de infección por F, y poblaciones muy poco infectadas o, en su caso, infectadas por B). La selección a favor de

las hembras coinfectadas, capaces de dejar descendencia independientemente de la infección paterna, podría incrementar (en teoría) los niveles de coinfección hasta alcanzar un equilibrio estable, tal como proponen distintos modelos (Turelli, 1994; Hoffmann *et al.*, 1998). Sin embargo, recordemos que en el caso de *C. parallelus* no se observa la fijación de la coinfección, salvo en casos puntuales.

A su vez estos autores proponían la coincidencia entre los altos niveles de coinfección de Sallent de Gállego, y la brusca caída del marcador cromosómico "banda P" del cromosoma X. Esta propuesta considera que un incremento en los niveles de coinfección podría fijar el citoplasma de Cpe, estableciéndose por consiguiente un determinado haplotipo mitocondrial o mitotipo, como ya hemos indicado anteriormente. Este hecho puede tener relevancia en la estructuración de la zona híbrida (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Serán necesarios nuevos experimentos destinados a corroborar este supuesto.

Si consideramos esta hipótesis, el efecto conjunto de la IC así como la presunta incompatibilidad entre la banda P propia de *C. parallelus parallelus* y el citoplasma de *C. parallelus erythropus*, afectarían al sistema de cruzamientos. Uno de los efectos de la incompatibilidad citoplasmática unidireccional podría ser la introgresión de los marcadores mitocondriales de Cpp a poblaciones de Cpe, así como otros marcadores, como efectivamente parece ocurrir en poblaciones naturales (ver Fig. 88, para una simplificación de este tipo de incompatibilidades).

De este modo *Wolbachia*, junto a factores intrínsecos a la zona híbrida, podría inducir una estructuración genética de las poblaciones, que condicionaría el flujo génico entre las poblaciones puras de Cpe y Cpp, y así como la transmisión de cualquier gen de herencia materna.

Resulta complicado separar los efectos de la IC frente a las posibles incompatibilidades nucleares, sin embargo, la existencia de otra zona híbrida para *C. parallelus*, esta vez caracterizada en Alpes marítimos (Flanagan *et al.*, 1999) puede aportarnos información útil a este respecto. En este estudio, los autores describen citogenéticamente otra zona híbrida de *C. parallelus* situada a lo largo del Col de L'Arche, entre Italia y Francia. La visualización de bandas C permitió detectar una banda de heterocromatina distal (A) en los individuos franceses cuya composición nucleotídica aparentemente difería en principio de la banda P (detectada en los Pirineos), debido a su tinción diferencial con fluorocromos específicos para regiones de ADN con riqueza relativa en pares de bases AT o GC. Esta banda disminuía su frecuencia a lo largo de la zona híbrida, desapareciendo en individuos italianos y, a su vez, presentaba actividad nucleolar (NORs) asociada.



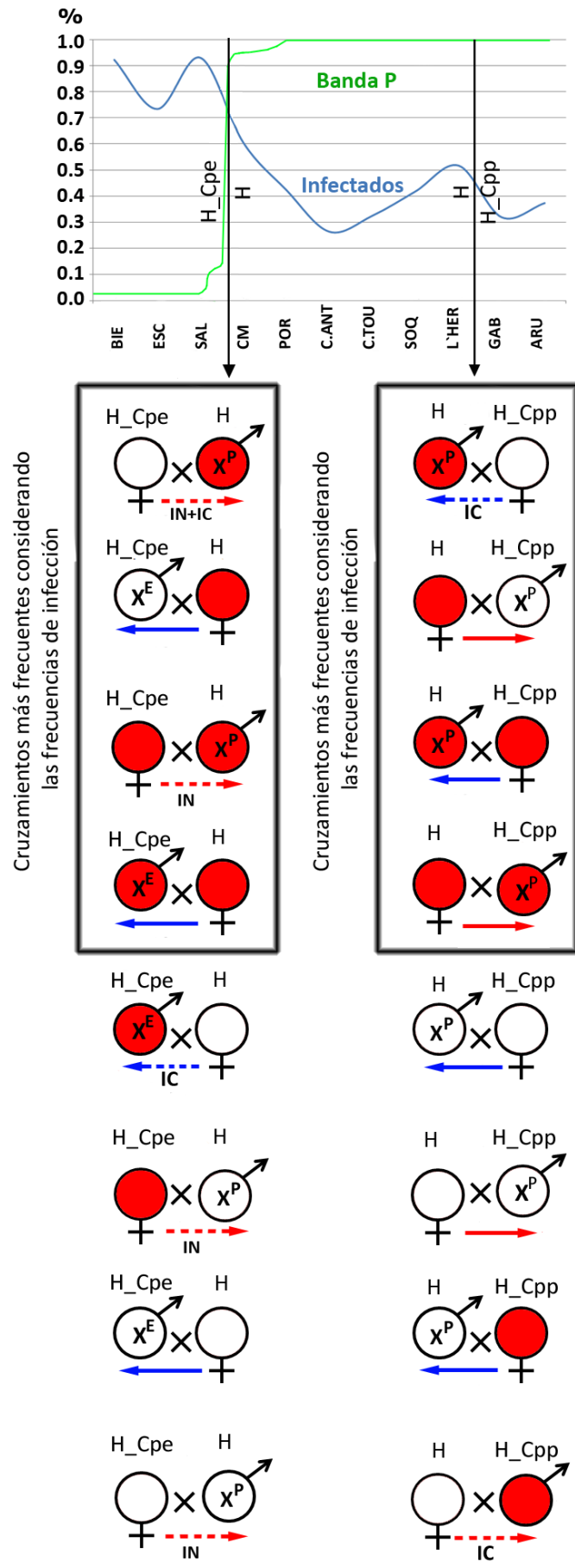


Fig. 88: Esquema del régimen de cruzamientos teóricos a ambos lados de la zona híbrida, como proponemos para las poblaciones cercanas a Sallent de Gállego y L'Hermine. Al igual que en figuras anteriores, los círculos rojos indican que el individuo está infectado por *Wolbachia*, mientras que los blancos indican un individuo no infectado. Las frecuencias de infección serán las mostradas en la gráfica de la parte superior.  $X^P$  representa la presencia de la banda heterocromática P (propia de Cpp) en el cromosoma X de los individuos macho, mientras que la  $X^E$  representa la de la banda E (propia de Cpe). En las hembras no se indica su tipo respecto al cromosoma X. La nomenclatura H\_Cpe o H\_Cpp intenta reflejar el carácter híbrido de estos individuos, pese a presentar características propias de uno de los parentales para el rasgo considerado. Las flechas rojas y azules nos indican la posible introgresión de marcadores citoplasmáticos de Cpp a Cpe (azul), y de Cpe a Cpp (rojo). Las líneas discontinuas representan una reducción en algún grado de los descendientes de estos cruzamientos debido a IC y/o IN (dependiendo si el individuo porta o no la banda P). Debemos tener en cuenta que se trata de una modelización ideal y simplificada. Se expone la existencia tanto de incompatibilidad citoplasmática (IC), como posibles incompatibilidades nucleares (IN), asumiendo que los híbridos macho portan la banda P acorde con las frecuencias de dicho marcador (gráfica de la parte superior), y que los individuos H\_Cpe presentan características citoplasmáticas de Cpe. En esta simplificación, las incompatibilidades nucleares se producirán en los cruzamientos entre individuos machos que portan dicho marcador  $X^P$ , y hembras con el el citoplasma tipo-H\_Cpe.

Esta nueva zona híbrida alpina, en comparación con la pirenaica, presenta una diferencia relevante: una clina mucho más ancha para esta banda de heterocromatina (21,80 Km en el caso de Col de L'Arche, frente a 1 Km aprox. en el caso de los Pirineos). Una clina mucho más ancha que en los Pirineos podría ser indicativa de que no existen fuerzas evolutivas que eviten esta introgresión (una vez descartados factores orográficos, ecológicos, etc.). A su vez, los autores describieron alteraciones meióticas en los híbridos, que indicaban la diferenciación entre los individuos de las poblaciones al norte y sur de Col de L'Arche. Los datos de Lunt *et al.* (1998) mostraban a su vez una introgresión de estos marcadores desde las poblaciones francesas a las poblaciones italianas, más acentuada que en el caso de Pirineos.

Hay dos diferencias relevantes entre ambas zonas híbridas. En primer lugar, obviamente la diferenciación que hayan sufrido las poblaciones de *C. parallelus* refugiadas en la Península Italiana durante la última glaciación, no tiene porqué ser la misma que en la Península Ibérica. No conocemos qué genes pueden estar implicados, y su grado de divergencia.

Otro dato relevante es que no existen diferencias en la (baja) tasa de infección por *Wolbachia* a ambos lados del puerto alpino (Fig. 25). En ambas vertientes el patrón de infección es similar al de otras poblaciones europeas, con niveles bajos de infección y, en su caso, infección por el supergrupo B. Este último punto podría ser relevante para explicar las diferencias entre ambas zonas híbridas, dado que en esta ocasión las posibles IN no se verían estabilizadas por la existencia de IC, lo que podría favorecer clinas más anchas. Por supuesto, este último punto es claramente especulativo, pero sería interesante profundizar en esta hipótesis en un futuro.

Por otra parte, las cepas adscritas al supergrupo F detectadas en estas poblaciones son las mismas que existen en las poblaciones eslovenas, o en el resto de la Europa no ibérica, lo que concuerda con los patrones de expansión poblacional desde el refugio balcánico. Ya sugirieron Flanagan *et al.* (1999) que las poblaciones del norte de Italia (muy diferentes a nivel mitocondrial de aquellas situadas en el centro y sur de la Península Italiana) tuvieran un origen relacionado con las poblaciones de los Balcanes, debido a la posibilidad de haber atravesado los Alpes por la región de Trieste, cuyos picos no superan los 1000 metros. Sería sin duda interesante disponer de muestras de otras regiones del sur de Italia, así como de los Balcanes, para corroborar esta hipótesis.

#### **34.19 Utilidad del MLST en la valoración de las consecuencias de la IC en la zona híbrida de *C. parallelus*.**

La utilización de un sistema de clasificación Multilocus (MLST) nos permite describir las distintas cepas (ST) de *Wolbachia* que infectan *C. parallelus*. Este análisis es esencial, dado que los procesos de incompatibilidad propuestos podrían darse, tal y como se ha descrito en la bibliografía, no sólo entre supergrupos, sino a nivel de cepa (ST), incluso perteneciendo éstas al mismo supergrupo (Bordenstein & Werren, 2007).

#### **34.20 Relevancia del supergrupo F infectando a *C. parallelus*.**

Otro aspecto en sí mismo a destacar es la propia infección por el supergrupo F de *C. parallelus*, que en concreto, ha sido descrito previamente en insectos, pero es la primera vez que se refiere en la familia Acrididae.

Recordemos que este supergrupo, relativamente poco conocido, infecta tanto a insectos, como a nematodos (a diferencia del supergrupo B, descrito hasta ahora únicamente en artrópodos (Lo *et al.*, 2002; Slatko *et al.*, 2010)). Esto supone un aliciente para el estudio tanto del origen de la infección por *Wolbachia* de ambos grupos (para determinar el hospedador original de este género bacteriano), como para el origen de las relaciones de simbiosis-patogenicidad de esta bacteria.

A su vez, el supergrupo F de *Wolbachia*, tiene un especial interés desde el punto de vista de la evolución del género. Bordenstein & Rosengaus (2005) sugieren el origen de este supergrupo en procesos de transferencia horizontal de estas cepas bacterianas entre insectos y nematodos hace aproximadamente 100 millones de años.



Uno de los principales inconvenientes del sistema MLST utilizado, es el bajo número de secuencias disponibles actualmente para este supergrupo. Hay que tener en cuenta que muchas de las especies infectadas por el supergrupo F de *Wolbachia* o bien aun no han sido analizadas en base al sistema MLST descrito para este género, o bien las secuencias aun no han sido incluidas como tales en las bases de datos. Es por esto que las filogenias construidas son susceptibles de mostrar artefactos.

Además, hay que tener en cuenta la existencia de múltiples secuencias “anónimas”, cuyo hospedador, origen geográfico, autores, etc., se desconocen y que sólo aparecen en las bases de datos caracterizadas con el número alélico asignado dentro del MLST (por propio deseo de sus autores). Estas secuencias, pese a ser útiles en la reconstrucción filogenética, limitan la interpretación biológica de los resultados y dificultan seguir la expansión de este supergrupo a través de distintos órdenes de insectos.

#### **34.21 Posibles implicaciones de la infección por distintas cepas F de *Wolbachia* en la dinámica de la zona híbrida de *C. parallelus*.**

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, se plantea la posible existencia de incompatibilidad bidireccional, no sólo entre los individuos infectados por los supergrupos B y F como ya ha sido demostrado (Zabal-Aguirre pers. com.; Bella *et al.*, 2010), si no entre distintas cepas pertenecientes al supergrupo F. Aunque carecemos de datos que corroboren aún este escenario, no sería descartable la existencia de IC bidireccional entre los distintos complejos detectados pertenecientes al supergrupo F. De hecho, en los estudios realizados en *Nasonia sp* se ha detectado IC entre cepas pertenecientes al supergrupo A (Bordenstein & Werren, 2007). Esta hipótesis, que surge de nuestro análisis filogenético, debe ser valorada en el marco de la zona híbrida. Los nuevos datos abren la posibilidad de diseñar experimentos con el fin de comprobar la existencia de esta alteración reproductiva, así como su posible influencia en la dinámica de la zona híbrida.

Si la hipótesis fuese correcta, el sistema descrito se complicaría aún más, dado que aparte de las incompatibilidades genéticas consecuencia de la divergencia en alopatría entre subespecies, deberían contemplarse las incompatibilidades citoplasmáticas entre:

- (i) Poblaciones con altas tasas de infección frente a otras con frecuencias de infección bajas,
- (ii) Individuos infectados por distintos supergrupos bacterianos,



- (iii) Individuos infectados por distintas cepas dentro del mismo supergrupo, y entre
- (iv) Distintos niveles de IC entre las distintas cepas de F y la cepa B descrita.

La correspondencia entre los distintos complejos ST caracterizados con la distribución geográfica de las poblaciones en las que han sido detectados, apoyaría esta hipótesis. Los datos de los que disponemos muestran un patrón muy estructurado de la infección por ambas cepas F (complejos Cp\_ST1 y Cp\_ST5). No se ha observado la introgresión de las cepas F de *Wolbachia* características de gran parte de las poblaciones europeas (complejo Cp\_ST1), en las poblaciones del centro peninsular, que presentan una fuerte infección por las cepas del complejo Cp\_ST5, así como en otras poblaciones del sur del Pirineo. Esto hace sospechar que pueda existir incompatibilidad entre estas cepas, si bien sería necesario establecer cruzamientos para corroborar esta hipótesis.

Esto podría potencialmente favorecer la divergencia entre las poblaciones de Cpe (infectadas por altas tasas de infección por el supergrupo F, en este caso pertenecientes al complejo Cp\_ST5) y poblaciones de Cpp, con menores tasas de infección (induciendo IC unidireccional) y que de existir, estaría causada bien por el supergrupo B (provocando IC bidireccional), bien por el supergrupo F (complejo Cp\_ST1), pudiendo existir además IC entre complejos ST. El interés en este punto concreto del estudio hace necesario un mayor esfuerzo en la valoración de la posible IC bidireccional entre complejos ST. De todas maneras, debido a las bajas frecuencias de infección de las cepas del complejo Cp\_ST1 en las poblaciones de Cpp, su efecto sobre la dinámica de la zona híbrida, sería bajo, prevaleciendo el efecto de la IC unidireccional y, en su caso, de la IC bidireccional entre el supergrupo F y B.

#### **34.22 Posibles implicaciones de la aparición de cepas recombinantes en las poblaciones híbridas de *C. parallelus*.**

La detección de cepas recombinantes en las poblaciones híbridas de *C. parallelus* supone la detección de cepas o STs características de estas poblaciones, y que en muchas ocasiones no se han detectado fuera de la zona híbrida. La diferenciación entre las cepas bacterianas en estas poblaciones híbridas y el resto de poblaciones de *C. parallelus* coincide con la aparición de otros rasgos genéticos propios de la zona híbrida.

Por ejemplo, esto concuerda con los datos mostrados por Sarasa (2013), en su tesis doctoral, donde se observa mediante el análisis de microsatélites una diferenciación de las poblaciones híbridas, respecto a las subespecies parentales. A su vez, concuerda con la aparición

de alelos raros tanto en las cepas de *Wolbachia* detectadas en este estudio en las poblaciones híbridas (alelos recombinantes), como en las propias poblaciones híbridas del hospedador (Hewitt, 1993) con la aparición de la banda H, característica exclusivamente de estas poblaciones híbridas (Bella *et al.*, 1993), o con cierta variación morfométrica detectada recientemente (Dr. P.L. Mason, com. pers.).

Este escenario, podría sugerir la diferenciación incipiente a nivel genómico y bacteriano (citoplasmático) de las poblaciones híbridas respecto a las subespecies parentales, y hace resurgir la hipótesis de especiación por hibridación (Anderson, 1949; Anderson & Stebbins, 1954), extremadamente polémica durante muchos años, e incluso ridiculizada.

Los miembros del “*Hybridization and Speciation workshop*”, celebrado en Gregynog Hall, en Gales (UK), publicaron recientemente una revisión sobre este tema (Abbott *et al.*, 2013), en la que se llama la atención a la comunidad científica sobre la relevancia de considerar esta hipótesis, en numerosas ocasiones desestimada sin pruebas experimentales notables. En dicha revisión se recogen datos sobre posibles casos de especiación inducida por hibridación, y se revisan los posibles mecanismos implicados.

En la actualidad cobra fuerza que la hibridación entre especies parentales pueda suponer una fuente importante de diversidad genotípica y fenotípica, al permitir a distintos *loci*, que hasta ese momento no habían interactuado, ponerse en contacto en un nuevo entorno genómico. Este nuevo entorno genómico favorecería a su vez la aparición de epistasis entre genes, reorganizaciones genómicas (deleciones, duplicaciones...), restructuración de elementos transponibles, así como nuevos patrones de expresión génica (Ranz *et al.*, 2004; Masly *et al.*, 2006; Landry *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2008; Michalak, 2009; Nei & Nozawa, 2011). De hecho se ha comprobado la evolución rápida de los genes de regulación en estas situaciones (Castillo-Davis *et al.*, 2004). Sin embargo, no debemos olvidar que este incremento de diversidad no necesariamente debe conducir a la aparición de un nuevo taxón, de hecho, la hibridación suele ir asociada, al menos inicialmente, a una reducción en el *fitness* de los híbridos. La hibridación como proceso supone un equilibrio entre la “generación de incompatibilidades”, y la “novedad evolutiva”.

El proceso de hibridación, por tanto, podría ser una fuente de diversidad (con un incremento o reducción del *fitness* de los híbridos) sobre la que actuaría la selección. Este fenómeno sería especialmente importante en aquellos casos en los que los híbridos ocuparan un nuevo ambiente; en ocasiones se ha definido este proceso como “introgresión adaptativa”. La selección exógena permitiría mantener la diferenciación de los híbridos de los parentales, incluso cuando el contacto entre ambas poblaciones no se elimine. (Abbott *et al.*, 2013) exponen



varios ejemplos de nuevos taxones cuyo origen es la hibridación seguida de una selección positiva de los nuevos fenotipos, en ocasiones llamados “híbridos homoploides” (Mallet, 2005).

En el caso de la zona híbrida de *C. parallelus*, el rol de los endosimbiontes, aunque no es generalmente considerado, podría tener un papel importante al ser la ecología microbiana de los híbridos diferente a la de los parentales. Por una parte esta comunidad bacteriana interacciona genéticamente con su hospedador, pero por otra, podría ser considerada parte del “ambiente” del hospedador, actuando de forma sinérgica, como podrían actuar otras variantes ambientales.

Nuestros datos han comprobado que la estructura genética de las cepas de *Wolbachia* detectadas en las poblaciones híbridas de *C. parallelus* es muy diferente de aquella presente en los parentales. Sin embargo no sabemos en qué se traducen estas interacciones, si suponen o no una ventaja adaptativa para el hospedador. Por tanto, no podemos descartar que esta nueva ecología microbiana pudiera interaccionar con los hospedadores híbridos y favorecer esta diferenciación con respecto a las poblaciones puras de ambos extremos.

#### *Incompatibilidad citoplasmática.*

Las implicaciones de que existan cepas recombinantes en las poblaciones de la zona híbrida pueden ser también importantes al considerar los niveles de incompatibilidad citoplasmática entre cepas. Los cruzamientos experimentales realizados por M. Zabal-Aguirre en el marco de su tesis doctoral, permitieron estimar unos valores de  $H_{BI}=0.83$  entre los supergrupos F y B. Sin embargo, la existencia de recombinantes puede hacer que no todos los cruzamientos entre supergrupos contribuyan por igual a dicha estima. Actualmente no disponemos de datos experimentales que cuantifiquen este posible efecto.

### **34.23 *Wolbachia* y su papel en el “reinforcement”.**

Podemos definir el *reinforcement* como el mecanismo por el cual, tras un proceso de contacto secundario en el cual hibridan dos taxones parentales y dan lugar a híbridos cuyo *fitness* se ve disminuido, la selección natural promueve las preferencias de apareamiento de los individuos con aquellos de su mismo tipo, favoreciendo la divergencia de los parentales (Ridley, 2004b).

Telschow *et al.* (2005a) demostraron matemáticamente el papel que *Wolbachia* podía tener en este proceso, debido a su potencial de reducir el flujo génico y promover la selección de procesos de aislamiento pre-cigótico, incluidos los procesos que conducen a la selección de



pareja. De este modo, las frecuencias de cualquier carácter que favoreciera los cruzamientos en los que no fuese a inducirse incompatibilidad citoplasmática, se incrementarían en la población. Por ejemplo, una hembra no infectada que pudiera seleccionar preferencialmente a los machos no infectados, tendría una ventaja frente a aquellas hembras cuyos cruzamientos son aleatorios. Cuanto mayor sean las tasas de infección, más relevante es la selección actuante, y por tanto, este comportamiento podría expandirse más fácilmente en la población.

La importancia de *Wolbachia* en la dinámica teórica de una zona híbrida recaería en la estabilización de incompatibilidades nucleares ya existentes, lo que incrementa notablemente el tiempo necesario para la homogeneización de las poblaciones. Esto supone un tiempo extra en el que podría favorecerse la aparición de *reinforcement*.

Por su parte Jaenike *et al.* (2006) comprobaron experimentalmente que la selección de la pareja acorde con la infección por *Wolbachia*, podía explicar los patrones de elección de apareamiento observados en el comportamiento de *Drosophila recens* y *D. subquinaria*. Los autores observaron que la infección por una cepa de *Wolbachia* inductora de IC podía dirigir un *reinforcement* asimétrico, como el observado en estas especies.

Recientemente se han observado apareamientos selectivos acorde con la infección de la hembra en *Armadillium vulgare*, de modo que los machos se veían más atraídos por hembras no infectadas que por hembras infectadas (Richard *et al.*, 2012). Otros autores han observado la influencia de *Wolbachia* en la comunicación química en *Drosophila paulistorum*, y su influencia en la elección de pareja (Schneider *et al.*, 2012). Estos descubrimientos apuntan a la posibilidad de la infección pueda inducir cambios en el comportamiento sexual de los organismos, lo que tendría interesantes consecuencias evolutivas.

No existen muchos datos sobre el posible papel que *Wolbachia* pudiera tener a este nivel en *C. parallelus*. Estudios previos muestran que en *C. parallelus* existen comportamientos de selección de pareja. Se ha observado que las hembras de *C. parallelus erythropus* muestran un comportamiento selectivo más acentuado que las hembras de *C. parallelus parallelus* (Ritchie *et al.*, 1989; Ritchie, 1990; Butlin & Ritchie, 1991). Esto concuerda con que las hembras de *C. parallelus erythropus*, fuertemente infectadas, pudiera verse favorecida la capacidad para seleccionar a su pareja.

El interés de este punto, ha permitido comenzar una colaboración con el laboratorio del Prof. Roger Butlin (University of Sheffield, UK), para analizar si *Wolbachia* influye en la selección de pareja de las hembras de *C. parallelus*. De momento los datos experimentales permiten sugerir que las hembras infectadas por *Wolbachia* son más selectivas en las cópulas. A su vez, se ha demostrado que los machos infectados presentan un comportamiento sexual más activo (J.





Dorling, com. pers.). Estos datos son preliminares, si bien esperamos obtener más información al respecto en breve.

## **35 DETECCIÓN DE WOLBACHIA Y OTROS ENDOSIMBIOTES**

### **MEDIANTE PCR-DGGE**

#### **35.1 Ecología microbiana de *C. parallelus*: Análisis mediante PCR-DGGE.**

Recientemente hemos asistido a un interés creciente en la biología de parásitos reproductivos, centrada principalmente en *Wolbachia*. Sin embargo, en los últimos años, otras bacterias de transmisión materna como *Spiroplasma*, *Cardinium*, *Flavobacterium* y *Rickettsia*, han atraído el interés de la comunidad científica, como posible manipuladores de la reproducción de sus hospedadores (Duron *et al.*, 2008).

Los nuevos datos, han incrementado el número de ejemplos de “especies” bacterianas capaces de inducir barreras entre los organismos a los que parasitan. Por ello, se considera importante caracterizar adecuadamente la comunidad bacteriana de la especie hospedadora antes de interpretar determinados experimentos, por ejemplo los resultados de cruzamientos dirigidos en los que se observe alguna alteración reproductiva (Weeks *et al.*, 2007). En nuestro caso, la correcta caracterización de la comunidad bacteriana infectando a *C. parallelus* sirve para confirmar que la incompatibilidad unidireccional y bidireccional detectada en esta especie (Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre, com. pers.) debe relacionarse exclusivamente con la infección por *Wolbachia*.

Nuestro estudio de la ecología microbiana de *C. parallelus* mediante PCR-DGGE es congruente con el análisis preliminar realizado por Dillon *et al.* (2008), en el cual se analizaba el estómago de un individuo de esta especie mediante PCR-DGGE. En dicho estudio se identificó la presencia de *Wolbachia* sp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. y otras  $\alpha$ -proteobacterias no identificadas. Dichos resultados mostraban una flora bacteriana reducida respecto a otros acrididos estudiados y, lógicamente restringida al aparato digestivo y, al menos en parte, asociada a la función digestiva de estos organismos.

##### **35.1.1 Confirmación de la infección por *Wolbachia*.**

La infección por *Wolbachia* ha sido extensamente estudiada en *C. parallelus*, dada su implicación en la zona híbrida de este ortóptero y la existencia de incompatibilidad



citoplasmática asociada a la presencia de esta bacteria (Martínez *et al.*, 2009; Bella *et al.*, 2010; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b; Sarasa *et al.*, 2013).

Las muestras seleccionadas para este estudio, fueron previamente caracterizadas por una PCR estándar (Martínez *et al.*, 2009; Zabal-Aguirre *et al.*, 2010; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013c) con el fin de identificar su infección por *Wolbachia*. De este modo, pudimos comprobar que todos individuos positivos en esta primera PCR, fueron también amplificados en la PCR-DGGE y mostraban las bandas características de su infección por *Wolbachia* en la electroforesis de gradiente. Este control, nos permite confirmar la efectividad de los *primers* usados en la PCR-DGGE para detectar *Wolbachia* (así como la bondad del análisis mediante PCR estándar).

Nuestros datos además confirman la aparición de distintas cepas de *Wolbachia* en relación al gen *16s rRNA*, asociadas a distintas poblaciones (ver secciones “Caracterización de las cepas de *Wolbachia* que infectan a *C. parallelus* en base al gen *16S rRNA*.”, pág. 248). A su vez, descartamos la aparición de otros supergrupos de *Wolbachia* infectando *C. parallelus*. La aparición exclusiva de los supergrupos F y B, ratifica los resultados previos, y descarta la existencia de algún otro supergrupo no amplificado por los *primers* generales de *Wolbachia* empleados en el estudio (Giordano *et al.*, 1995). Este punto es importante debido a que estos *primers* fueron diseñados cuando no se conocía la existencia de gran parte de los supergrupos actuales (recordemos que son 8: ver la sección de Introducción). Por otro lado, se confirma la aparición de individuos coinfectados en gran parte de las poblaciones, descartando conjuntamente con las técnicas de secuenciación que estos resultados sean productos de la inespecificidad de los *primers* empleados en la PCR estándar.

Un punto interesante es este sentido es que no se han observado individuos simultáneamente infectados por dos tipos distintos de F (ver que en Fig. 67, no se da la aparición de las bandas 1a y 1b simultáneamente). Este dato debe tomarse con precaución, dado que el número de individuos analizados en los que podría darse potencialmente esta situación (poblaciones híbridas, en las que contactan ambos patrones de infección por las dos cepas principales del supergrupo F), es reducido. Por otro lado, la diferencia en su patrón de electroforesis es mínima, por lo que en algunos individuos en los que la intensidad de la amplificación ha sido fuerte, es posible que no se distinguiera una doble banda. Sin embargo, cabe destacar que en una misma población aparecen individuos infectados por una cepa, e individuos infectados por la otra. Este hecho puede verificarse a nivel molecular utilizándose otros marcadores, como puede ser el sistema MLST, comprobándose que pueden existir varias cepas incluso del mismo supergrupo infectando a una misma población (Tabla 6).

A su vez, la aparición de dobles picos en los cromatogramas de las secuencias del MLST en algunos individuos, podría sugerir la posibilidad de coinfección de varias cepas del mismo supergrupo en el mismo organismo. Si bien, que este hecho haya sido puntual, puede indicarnos que es un fenómeno poco frecuente e incluso podría deberse a la manipulación experimental.

En un contexto especulativo, dado que no disponemos de datos que apoyen esta hipótesis, estos resultados podrían indicar de forma indirecta una posible incompatibilidad entre los dos grupos de cepas F detectados, una posibilidad antes apuntada (ver sección “Relevancia de que el supergrupo F infecte a *C. parallelus*”, pág. 297) a la vista de la distribución tan restringida de ambas cepas a lo largo de la zona híbrida, y de los datos existente en otras especies en las que cepas muy cercanas filogenéticamente son capaces de causar IC bidireccional (Bordenstein *et al.*, 2003; Bordenstein & Werren, 2007).

### **35.1.2 Infección por *Spiroplasma*.**

#### *Comunidades bacterianas.*

La influencia de los endosimbiontes en la biología de sus hospedadores hace necesario conocer la diversidad de la flora bacteriana presente en *C. parallelus*. Concretamente, aquellos endosimbiontes que pueden tener algún efecto en la reproducción de este organismo, debido a la importancia que pudiera tener en la dinámica de la zona híbrida (Shuker *et al.*, 2005a; Bella *et al.*, 2010). Como ya se ha indicado anteriormente, en los últimos años se han descrito nuevas especies bacterianas con la posibilidad de causar distintos efectos en la reproducción de sus hospedadores, incluyendo incompatibilidad citoplasmática (Duron *et al.*, 2010).

En este sentido, la ausencia de otros endosimbiontes que pudieran inducir esta alteración reproductiva en *C. parallelus* es relevante, dado que valida la interpretación de la incompatibilidad inducida por *Wolbachia* (y únicamente por *Wolbachia*) detectada en este ortóptero (Zabal-Aguirre, pers. com; Bella *et al.*, 2010). Por ejemplo, esta interpretación tendría que haber sido reinterpretada si se hubiese detectado *Cardinium*, debido a su capacidad para inducir IC (Zchori-Fein & Perlman, 2004).

En el marco de esta tesis doctoral se ha detectado por primera vez la infección por *Spiroplasma* en el hospedador *C. parallelus*, abriendo toda una serie de preguntas y cuestiones sobre la influencia de este endosimbionte en la biología de su hospedador (Jaenike *et al.*, 2010), y concretamente en la dinámica de la zona híbrida. *Spiroplasma* ha sido asociada generalmente a alteraciones en la reproducción de sus hospedadores, induciendo generalmente la muerte selectiva de los machos, aunque su fenotipo varía acorde con el hospedador (Gasparich *et al.*,



2004; Haselkorn, 2010; Anbutsu & Fukatsu, 2011). En el caso de *C. parallelus*, no se ha observado este efecto (ver sección “Multi-infección por los géneros *Wolbachia* y *Spiroplasma*”, pág. 199), por lo que el papel de *Spiroplasma* en la zona híbrida parece limitarse a las posibles interacciones que se pudieran producirse entre *Spiroplasma* y *Wolbachia* (Goto *et al.*, 2006; Montenegro *et al.*, 2006; Enigl & Schausberger, 2007; Jaenike *et al.*, 2010), y en ningún caso alterando la interpretación de los datos experimentales en relación a la incompatibilidad inducida por *Wolbachia*.

Los estudios filogenéticos realizados en relación al gen *16S rRNA* de esta bacteria permiten adscribir las cepas detectadas en *C. parallelus* dentro del clado Citri-Chrysopicola-Mirum. El árbol obtenido es concordante con los estudios previos realizados por Gasparich *et al.* (2004) sobre este género bacteriano (Fig. 68). La inclusión de nuestras cepas en este clado concuerda con lo que conocemos sobre la filogenia de esta bacteria, debido a que gran parte de las cepas descritas como endosimbiontes de insectos se incluyen en él. Entre los insectos cuyos endosimbiontes se adscriben dentro de este clado encontramos casos en coleópteros (*Adalia bipunctata*, *Anisosticta novemdecimpunctata* y *Harmonia axyridis*) (Majerus *et al.*, 1999; Tinsley & Majerus, 2006b), lepidópteros (*Danaus Chrysippus*) (Jiggins *et al.*, 2000), himenópteros como las abejas (Clark *et al.*, 1985), homópteros como las chicharras (Breton *et al.*, 2010) o dípteros, incluida *Drosophila* sp. (Montenegro *et al.*, 2005). También los endosimbiontes de otros artrópodos como algunos ácaros, incluyendo garrapatas (Tully *et al.*, 1995).

Gran parte de las cepas adscritas al clado *Citri-Chrysopicola-Mirum* se caracterizan por causar alteraciones reproductivas, como por ejemplo la muerte selectiva de los machos citada. En el caso de *C. parallelus*, la infección por *Spiroplasma* no parece indicar que exista este efecto. En primer lugar se han detectado machos infectados en numerosas poblaciones y, pese a que el tamaño muestral no es elevado, no se han detectado diferencias entre los porcentajes de infección en machos y hembras. La ampliación de este estudio a nuevas poblaciones, respalda también este resultado (ver sección “Filogeografía de la infección por *Spiroplasma*”, pág. 200). Por otro lado, si *Spiroplasma* causara algún tipo de distorsión en la ratio entre sexos, otros estudios previos deberían haber detectado un número excesivo de hembras. Sin embargo, no se ha detectado esta situación en la naturaleza, ni en cautividad y, de hecho, en un estudio se observó un incremento en el número de machos asociado a otros efectos (Bella *et al.*, 1992).

Existen ejemplos de cepas cercanas filogenéticamente en las que no se ha descrito alteraciones en la reproducción de sus hospedadores (Anbutsu & Fukatsu, 2003; Kageyama *et al.*, 2006; Kageyama *et al.*, 2007; Anbutsu & Fukatsu, 2011). Cepas bacterianas próximas pueden mostrar distintos fenotipos dependiendo de múltiples factores, incluyendo el genotipo del

hospedador, de modo que estos efectos puedan verse atenuados o incluso suprimidos dependiendo de la composición genómica del hospedador (Jiggins *et al.*, 2002a; Charlat *et al.*, 2007; Carrington *et al.*, 2010). A su vez, los estudios filogenéticos realizados en este clado ponen de manifiesto que los fenotipos bacterianos han cambiado a menudo a lo largo de su historia evolutiva (Werren *et al.*, 1995).

Estos datos nos permiten poner en duda que *Spiroplasma* induzca alteraciones reproductivas o de otro tipo en *C. parallelus* y debido a los antecedentes mencionados, consideramos que es muy plausible que la cepa detectada no tenga estos efectos en nuestro organismo de estudio. Este dato es de especial importancia dado que nos permite descartar, con cautela, la revisión de la interpretación de los cruzamientos experimentales realizados. Por otro lado, *Spiroplasma* no ha sido asociada a fenómenos de incompatibilidad citoplasmática, por lo que no debería afectar a las estimas realizadas hasta el momento.

### 35.1.3 Infección por otras bacterias.

Como hemos indicado, la técnica de PCR-DGGE ha permitido detectar varias especies bacterianas en *C. parallelus.*, incluyendo *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* spp., *Sinobacteraceae* sp., *Lactococcus* sp. y *Clostridium* sp.

Algunas de estas especies ya habían sido caracterizadas en otras especies de insectos y artrópodos y posiblemente estén asociadas a estos clados. Los efectos sobre sus hospedadores son desconocidos, pudiendo ser simbioses habituales, o bien bacterias patógenas. *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. son géneros bacterianos habituales en el suelo y presentan características metabólicas variadas. *Acinetobacter* spp. está implicada en el almacenamiento de fosfatos. *Pseudomonas* spp. se ha caracterizado como un género muy complejo, relacionado con el metabolismo de compuestos aromáticos. A su vez ambos géneros están asociados al metabolismo de restos de plantas (Frederick & Caesar, 2000). El origen de estos organismos en nuestras muestras puede estar en la comunidad bacteriana del aparato digestivo de los individuos, así como en contaminaciones ambientales. Dichas bacterias han sido detectadas únicamente en 4 de los 30 individuos de *C. parallelus* analizados, fruto posiblemente de la disección previa de la gónada y exclusión del resto de material (donde quizás estuvieran presentes). Dillon *et al.*, (2008) ya describieron la presencia de *Pseudomonas* spp. en el aparato digestivo de este ortóptero.

Por otro lado se han descrito varias bacterias cuyo género no ha podido ser identificado inmediatamente. Se ha utilizado la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* y el

criterio del 97% de identidad, para clasificar una de estas cepas bacterianas como perteneciente al género *Sinobacter* sp. Este clado fue descrito recientemente por Zhou (2008). Se trata de una familia de gamma proteobacteria, orden Xanthomonadales. Son bacterias Gram-negativas, no se mueven y no forman endosporas. Recientemente fueron detectadas en hormigas (Funaro *et al.*, 2011).

También se detectó la presencia de *Lactococcus garvieae* (clase Bacilli). La secuencia de mayor identidad en las bases de datos del NCBI fue detectada en el análisis de la comunidad bacteriana del Coleóptero *Rinchophorus ferrugineus* (JN089369), si bien no se dispone de más datos. Finalmente, se detectó la presencia de una cepa de *Clostridium* spp. (clase Clostridia). De este género se había detectado previamente una secuencia en una larva de *Simulium innoxium* (Diptera) que presenta una identidad del 100% (JF733419).

Durante el estudio se detectaron de forma esporádica otras bacterias, si bien su inclusión fue descartada debido a su conexión con los humanos. Estas bacterias esporádicas no mostraron relación alguna con *C. parallelus*, y su detección no era recurrente en las muestras, lo que apunta a posibles contaminaciones ambientales.

### **35.2 Interacción entre *Wolbachia* y *Spiroplasma*.**

La coinfección por varios endosimbiontes es un fenómeno común en la naturaleza (Fukatsu & Ishikawa, 1993; Fukatsu *et al.*, 1998; Thao *et al.*, 2000; Thao *et al.*, 2002; Kikuchi & Fukatsu, 2003; Russell *et al.*, 2003), teniendo una gran importancia al permitir una interacción directa entre ellos.

Existen modelos teóricos (Engelstädter *et al.*, 2004) que predicen que aquellos endosimbiontes que inducen IC (por ejemplo *Wolbachia*), presentarían un comportamiento antagonista a aquellos cuyo fenotipo fuese la muerte selectiva de los machos (por ejemplo, *Spiroplasma* en numerosos sistemas). En función de esta predicción deberíamos esperar interacciones negativas entre ambos endosimbiontes en la naturaleza. Sin embargo, los datos de los que disponemos, en ningún caso apoyarían este fenotipo de *Spiroplasma* en *C. parallelus*, por lo que no esperaríamos este tipo de interacción negativa.

La coinfección entre *Spiroplasma* y *Wolbachia* ha sido descrita experimentalmente en varios sistemas biológicos (Montenegro *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006; Jaenike *et al.*, 2010). Se ha analizado la interacción entre *Wolbachia* y *Spiroplasma* en términos de densidad bacteriana, y de cómo la presencia de un endosimbionte modifica la densidad del otro en *Drosophila*, utilizando para ello líneas inoculadas artificialmente con ambos endosimbiontes. También se



estudió la distribución citológica de ambos (Goto *et al.*, 2006). En este organismo y caso concretos se observó una relación asimétrica entre ambas bacterias: aparentemente, la infección por *Wolbachia* no alteraba la densidad bacteriana de *Spiroplasma*. Sin embargo, la de *Wolbachia* disminuía considerablemente en presencia de *Spiroplasma*.

Por contra, Anbutsu & Fukatsu (2011) no detectaron influencia recíproca entre ambos endosimbiontes. En el estudio de Ventura *et al.* (2012) tampoco se encontraron evidencias de una asociación, positiva o negativa, entre ambos endosimbiontes. Ambos estudios fueron realizados también en *Drosophila* sp.

A su vez, se observó que la distribución citológica de ambas bacterias no era la misma. *Wolbachia* presentaba una distribución intracelular, tanto en las gónadas como el tejido somático, mientras que, si bien *Spiroplasma* podía encontrarse dentro las células de su hospedador, se encontraba mayoritariamente en la hemolinfa (Anbutsu & Fukatsu, 2003; 2006). La comparación de estos resultados con los obtenidos en *C. parallelus* presenta la dificultad principal de que la hemolinfa se pierde mayoritariamente durante el proceso de disección de los tejidos para su posterior fijación y preparación para el procesamiento histológico. Sin embargo, podemos confirmar la presencia de *Spiroplasma* en el tejido gonadal.

Esta interacción podría incluir fenómenos de competición bacteriana por los recursos, en este caso la explotación de los tejidos del hospedador, e incluso por el espacio físico (Mouton *et al.*, 2003; 2004; Kondo *et al.*, 2005). De hecho, el tejido del hospedador puede ser considerado un microhábitat para estos organismos, de características diferentes en función del órgano (facilidad para ser colonizado, presión del sistema inmune, capacidad nutritiva...), y con una carga bacteriana máxima que podría limitar la densidad microbiana (Goto *et al.*, 2006). En el caso de *C. parallelus*, esta asociación neutra no parece deberse a que ambos ocupen compartimentos o tejidos diferentes, dado que ambos endosimbiontes fueron detectados en las gónadas (PCR-DGGE, y FISH). Pese a ello, al carecer de datos sobre las densidades bacterianas de ambos endosimbiontes, no podemos descartar interacciones a ese nivel.

Goto *et al.* (2006) estimaron mediante PCR-cuantitativa diferencias notables entre la densidad bacteriana de ambas bacterias en distintos tejidos somáticos. Sin embargo, esta técnica presenta la limitación reconocida por los propios autores de asumir que el número de copias de los genes testados, se corresponde con el número de endosimbiontes. Pese a ello, detectaron altas densidades de *Spiroplasma* en las gónadas, en ocasiones incluso superiores a las de *Wolbachia*. En nuestro caso, la hibridación muestra densidades más elevadas en el caso de *Wolbachia* (con las limitaciones de usar la sonda EU338). Si bien, consideramos que para este fin la hibridación en tejido (ver siguientes apartados) debe ser considerada como una primera

aproximación al problema, y que la PCR cuantitativa nos podría aportar en el futuro datos más fiables en este aspecto.

Por otro lado, aunque existiese un efecto sobre las densidades de *Wolbachia* equivalente al descrito en *Drosophila* sp. (Goto *et al.*, 2006), la infección por *Wolbachia* es estable en gran parte de las poblaciones analizadas, al menos en el corto plazo, por lo que no consideramos que esa disminución de la densidad de la infección por *Wolbachia* descrita en *Drosophila* como consecuencia de *Spiroplasma* (sin llegar a hacerla desaparecer en ningún caso), tenga efectos drásticos en la evolución de la infección (o en sus consecuencias en la zona híbrida de *C. parallelus*).

De todas maneras, a la hora de comparar estos datos, debemos tener en cuenta que las líneas de *Drosophila* sp. citadas, fueron generadas artificialmente, y no se realizaron estudios de campo posteriores. La infección por *Spiroplasma* en *Drosophila* sp. se ha establecido en torno al 36% de las especies, y a su vez, en torno al 1-37% de los individuos en ellas. Además, raramente coexiste con *Wolbachia* (Watts *et al.*, 2009a). Debido a ello, es necesario tomar estos resultados de interacción con precaución, debido a que no se conoce con certeza lo que ocurre en condiciones naturales, y si estos resultados son extrapolables.

En nuestro caso, la coinfección por ambos endosimbiontes en aquellas poblaciones en las que se ha detectado *Spiroplasma*, parece algo frecuente en la naturaleza. Hemos detectado individuos coinfectados en 14 de las 20 poblaciones analizadas. A su vez, estos suponen entre un 8% a un 66% de los individuos analizados en cada población, dependiendo de ésta (Tabla 11). No disponemos de estudios que cuantifiquen la densidad bacteriana, sin embargo, los resultados muestran que la infección por uno de los endosimbiontes no condiciona la infección por el otro, en términos absolutos. No se observa interacción positiva o negativa entre ambos.

Finalmente comentar que la interacción entre endosimbiontes debe estar auto-regulada de tal modo que no se dañe (en exceso) al hospedador. Este escenario incluiría interacciones complejas entre bacterias, y con el sistema inmune del insecto, de las que conocemos muy poco (Koga *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2005). Este conocimiento limitado se ve acentuado debido a que gran parte de la información de la que disponemos procede de estudios sobre unos pocos endosimbiontes conocidos, por lo carecemos de una visión global de este tipo de interacciones.

### 35.3 Filogeografía de la infección por *Spiroplasma*.

La caracterización de la infección de *Spiroplasma* en *C. parallelus* permite detectar cierta estructuración geográfica, de tal modo que las poblaciones más cercanas a los Balcanes





presentan unos niveles de infección más altos, en contraposición de las poblaciones más distantes (Bubión, Inglaterra...), en las que incluso no se ha detectado a este endosimbionte. Sin embargo, los análisis efectuados muestran que esta estructuración aparente, asociada a la distancia geográfica entre poblaciones, no es estadísticamente significativa (Test de Mantel;  $r=0,15$ ;  $p=0,08$ ). Pese a ello, debemos tener en cuenta que el tamaño muestral de cada población es reducido, por lo que es posible que nuestros datos no tengan la potencia estadística necesaria para corroborar esa impresión. Por otro lado, el test de AMOVA, no nos permite apoyar una diferenciación clara entre las que hemos definido como “poblaciones centrales”, más cercanas a la zona de los Balcanes, y aquellas denominadas periféricas, incluidas las de la Península Ibérica.

Debido a que esta bacteria ha sido descrita como endosimbionte obligada, podríamos esperar que la expansión de la infección por *Spiroplasma* en *C. parallelus* hubiera sido simultánea a la expansión poblacional del hospedador tras la última glaciación. Debido a la alta tasa de infección detectada en *C. parallelus parallelus* cabe suponer una expansión de la infección desde las poblaciones más orientales de Europa, hacia el oeste. Sin embargo, la presencia de la misma cepa de este endosimbionte en poblaciones de *C. parallelus erythropus*, subespecie actualmente aislada de *C. parallelus parallelus* salvo en las zonas de contacto a lo largo del Pirineo, dificulta esta interpretación. Este hecho abre la posibilidad de una expansión más reciente bien mediada por transmisión horizontal, bien como consecuencia de la introgresión de la infección en esta subespecie antes de que las poblaciones del centro de la Península Ibérica quedasen aisladas.

Ambas hipótesis han sido previamente planteadas para la actual distribución de la infección por el supergrupo B de *Wolbachia* en *C. parallelus* (ver “El origen de la infección en *C. parallelus*”, pág. 271). Se contempló que la expansión del supergrupo B en la Península Ibérica fuese un ejemplo de introgresión de la infección de una subespecie a otra, tras el proceso de hibridación entre ambas subespecies, como se ha propuesto en otros modelos (Raychoudhury *et al.*, 2009), o bien consecuencia de la transmisión horizontal de la infección (hipótesis respaldada por la mayoría de los datos experimentales). En el caso de *Spiroplasma* no podemos distinguir entre ambas hipótesis, si bien la identidad de las secuencias detectadas en poblaciones muy lejanas entre sí, al menos a nivel del gen *16S rRNA*, parecen apoyar una expansión reciente, lo que es difícil de explicar como consecuencia de la presumiblemente lenta transferencia bacteriana de una especie a otra.

A su vez, la existencia de poblaciones no infectadas en la Europa periférica, incluidas las poblaciones inglesas, noruegas y dentro de la Península Ibérica, las de Ortigueira y Bubión,

podría interpretarse de dos formas. La hipótesis más parsimoniosa, sería que la expansión de este endosimbionte no ha alcanzado determinadas poblaciones. Otra alternativa sería la desaparición de la infección asociada a expansiones poblacionales, fenómeno ya caracterizado en el caso de *Wolbachia* en algunas especies de hormigas (Shoemaker *et al.*, 2000; Reuter *et al.*, 2005). En este caso, las hipótesis propuestas para la pérdida de la infección son diversas, desde un efecto fundador, a la deriva, e incluso adaptación a nuevos ambientes. Los datos de los que disponemos no nos permiten optar entre ambas posibilidades.

Finalmente, cabe destacar que, debido a que no se ha detectado interacción entre la infección de ambos endosimbiontes al menos en términos absolutos (infección/no infección), esperaríamos que la distribución de ambos fuese independiente. Por lo tanto, la coincidencia parcial de la distribución entre el supergrupo B de *Wolbachia*, y la infección por *Spiroplasma*, debería interpretarse en términos de la historia evolutiva de su hospedador, y no como consecuencia de la interacción entre ambos endosimbiontes. Esto es, la coincidencia de la distribución de la infección en algunas poblaciones debería interpretarse como una consecuencia de la expansión de *C. parallelus*, y los fenómenos de expansión de la infección entre subespecies.

## **36 DETECCIÓN DE WOLBACHIA Y OTROS ENDOSIMBIONTES MEDIANTE WCH.**

### **36.1 Detección de *Wolbachia* mediante WCH.**

La detección citológica de un endosimbionte es esencial a la hora de inferir su relación con su hospedador. Tanto la localización mediante anticuerpos, como su detección mediante FISH permiten conocer la localización precisa de estas bacterias frente a técnicas moleculares como la PCR, que nos dan información únicamente sobre su presencia o ausencia. Estas técnicas son aún más informativas cuando existen varios endosimbiontes asociados a un mismo hospedador, permitiendo conocer si las distintas especies bacterianas coexisten, o por el contrario se distribuyen en tejidos o compartimentos independientes (Brucker & Bordenstein, 2012b).

En relación a estas metodologías, la hibridación *in situ* de células completas, o *Whole Cell Hybridization*, es una técnica relativamente económica, y sencilla frente a la detección mediante anticuerpos, en muchas ocasiones, no comerciales. Por el contrario las sondas



marcadas para la detección bacteriana pueden diseñarse y adquirirse en un gran número de casas comerciales, dado que no son sino oligonucleótidos marcados en uno de sus extremos.

Nuestros resultados confirman la efectividad de esta técnica en la detección de *Wolbachia* en muestras de tejido de *C. parallelus*. A su vez, la adaptación de la técnica a aplastados de testículo, ha permitido desarrollar una alternativa de detección hasta ahora no explorada.

La WCH suele llevarse a cabo de forma rutinaria a unos 45°C, siendo esta temperatura un compromiso entre la especificidad de la técnica y la intensidad de la señal (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). En nuestro caso, se incrementó la astringencia de la técnica elevando la temperatura hasta los 48°C, y realizándose los lavados posteriores a 51°C para evitar una hibridación inespecífica. Por otro lado, y para confirmar la especificidad de la señal, se emplearon de forma paralela dos sondas propias de *Wolbachia*, la primera de ellas es específica del ARNr expresado a partir gen *16S rRNA* de esta bacteria, la segunda del ARNm codificado por el gen *wsp* (*Wolbachia surface protein*). La hibridación en ambos casos fue equivalente, por lo que se confirmó la especificidad de las sondas bajo estas condiciones de hibridación. Debe recalcar que el gen *wsp* es exclusivo de esta especie bacteriana (Baldo *et al.*, 2005), por lo que no se espera la hibridación de esta sonda en ninguna otra bacteria.

En el momento de ponerse a punto la técnica no se conocía la presencia de otros endosimbiontes en *C. parallelus* (Dillon *et al.*, 2008). Si embargo, estudios posteriores (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b) han demostrado que *Spiroplasma* infecta de forma regular a este ortóptero, como hemos visto. Pese a ello, se pudo comprobar que las condiciones de hibridación puestas a punto en estos primeros experimentos permiten distinguir entre ambos endosimbiontes.

La hibridación de sondas específicas de *Wolbachia* en cortes de tejido de *C. parallelus* confirman su presencia en las gónadas de esta especie de ortóptero y su distribución estrictamente citoplasmática, tal y como había sido descrito en otros hospedadores (Moran *et al.*, 2008; Serbus *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008a).

En general la densidad bacteriana en el tejido reproductivo de las hembras de *C. parallelus* ha sido relacionada en otros organismos con el nivel de incompatibilidad citoplasmática, así como con las tasas de transmisión (Serbus *et al.*, 2008). En el caso de *C. parallelus* se han observado diferencias entre organismos, aunque éstas no han sido cuantificadas. Si bien se podrían evaluar dichas diferencias mediante análisis de imagen, sin embargo, consideramos que la técnica más adecuada sería la PCR cuantitativa, debido a la variabilidad que presentan generalmente las técnicas de hibridación.



Por otro lado, las altas densidades bacterianas detectadas en los machos de *C. parallelus* podrían relacionarse con los fenómenos de modificación de la cromatina implicados en el mecanismo de modificación y rescate (Clark *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008b) que explicaría la existencia de incompatibilidad citoplasmática en esta especie (Zabal-Aguirre, com. pers.; Bella *et al.*, 2010). A su vez, Sarasa *et al.* (2013) describieron en *C. parallelus* ciertas alteraciones citogenéticas durante la espermatogénesis relacionadas precisamente con la presencia de esta bacteria. Los autores interpretaban estas alteraciones como efectos colaterales observables de estos mecanismos de modificación de la cromatina y que desencadenan los fenómenos de incompatibilidad observados.

Estas diferencias observadas en las densidades bacterianas pueden estar relacionadas tanto con factores intrínsecos (sistema inmune, patologías, etc.), como extrínsecos (condiciones ambientales, temperatura, exposición a antibióticos naturales a través de la dieta, edad de los machos...) (Zchori-Fein *et al.*, 2000; McGraw *et al.*, 2001; Berticat *et al.*, 2002; McGraw *et al.*, 2002b; Ikeda *et al.*, 2003b; a; Mouton *et al.*, 2003).

Los individuos analizados con esta técnica fueron muestreados de forma aleatoria en varias poblaciones, con características climáticas similares; sin embargo, no podemos garantizar que los organismos estuvieran expuestos a condiciones ambientales homogéneas. Tampoco se puede garantizar la homogeneidad genética de los distintos especímenes estudiados. Por otro lado, ésta sería la situación que nos encontraríamos en condiciones naturales, en donde potencialmente podríamos encontrarnos con organismos con distintos niveles de infección (independientemente del motivo), y por tanto, con índices de transmisión, así como de incompatibilidad, diferentes.

En relación con la espermatogénesis, cabe destacar la información que las técnicas de hibridación nos aportan sobre la distribución de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus* desde el comienzo de la espermatogénesis, hasta la formación del espermatozoide. La existencia de folículos infectados frente a otros no infectados se ha propuesto como mecanismo para explicar los distintos niveles de incompatibilidad citoplasmática (Bressac & Rousset, 1993). Sin embargo, en el caso de *C. parallelus* se observó infección por *Wolbachia* en todos los folículos analizados para un mismo individuo calificado previamente de “infectado”. Esto concuerda con los estudios de Clark & Karr (2002) y Clark *et al.* (2002; 2008) en *Drosophila* sp., en los que se describía que todos los cistos estaban infectados, pese a la existencia de cistos infectados con distinta densidad bacteriana. Además estos autores proponían que no era necesario el contacto íntimo entre la bacteria y las espermatogonias para generar aquellas alteraciones responsables en última instancia de la incompatibilidad citoplasmática.

En relación a la distribución de *Wolbachia* durante la espermatogénesis y posterior espermiogénesis, Serbus *et al.* (2008) describían de forma muy visual cómo esta bacteria tendería a agruparse progresivamente en uno de los polos de la espermatida temprana hasta su total eliminación en el espermatozoide maduro (Fig. 89).

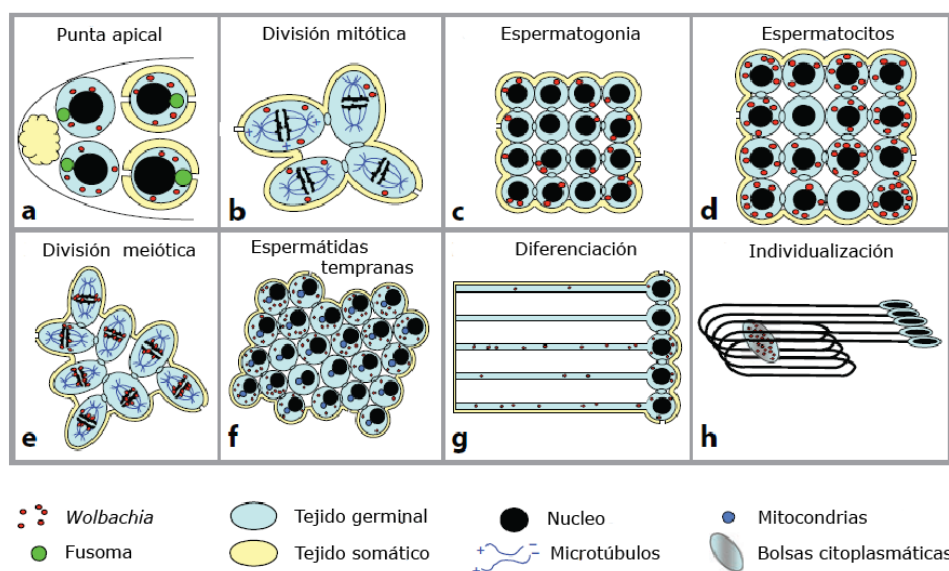


Fig. 89: Esquema ilustrando la distribución de la infección por *Wolbachia* a lo largo de la espermatogénesis de *Drosophila* sp., modificado de Serbus *et al.* (2008). Nótese la representación del fusoma, orgánulo presente de varios órdenes de insectos, específico de la línea germinal. Para una revisión ver Huynh (2000).

Los resultados de la hibridación realizada sobre cortes de testículo de *C. parallelus* han permitido, a su vez, confirmar dicha dinámica en *C. parallelus*, existiendo una agrupación progresiva de *Wolbachia* en uno de los polos de las espermatidas tempranas, hasta su total desaparición en las espermatidas maduras (Fig. 74). La pérdida progresiva de la infección se debe en este caso a un problema estérico, dado que la eliminación progresiva del citoplasma durante la espermiogénesis haría prácticamente inevitable la agrupación bacteriana y su posterior eliminación. Efectivamente, no se ha observado hibridación en el citoplasma de los espermatozoides maduros.

Este último punto tiene especial importancia a la hora de descartar, al menos teóricamente, la transmisión paterna de esta bacteria en *C. parallelus*, al no mantenerse en el citoplasma, reducido al mínimo, del espermatozoide. Los posteriores estudios sobre la transmisión de esta bacteria a partir del análisis de embriones resultantes de cruzamientos experimentales (resultados preliminares, no mostrados) realizados conjuntamente con otros miembros del grupo de investigación, parecen apoyar esta observación.

En otro sentido, esta técnica permitió confirmar la presencia de este endosimbionte en el tejido somático del hospedador. Previamente, Dillon *et al.* (2008) habían detectado la presencia de *Wolbachia* en el aparato digestivo de *C. parallelus*. Nuestro estudio permitió a su vez detectar altas densidades bacterianas en la gónada femenina, pero también en las glándulas accesorias, así como en el tejido conectivo que rodea a la genitalia en las hembras. Igualmente, cabe destacar la alta densidad bacteriana en los machos, principalmente en los miocitos, pero también en las células parietales que rodean los folículos.

Por otro lado, y como parte de los ensayos previos a la puesta a punto de la metodología para detectar *Wolbachia* mediante PCR, se había procedido a extraer ADN del fémur de varios individuos (población de Vielha, año 2008). Este experimento pretendía evaluar la posibilidad de detectar *Wolbachia* a partir de una de las patas del insecto, y evitar de este modo el sacrificio del organismo. Esta metodología se prometía útil por ejemplo para el establecimiento de cruzamientos dirigidos en los que fuera necesario conocer *a priori* la infección de los parentales. Tras la detección de *Wolbachia* en el fémur se intentó correlacionar con la infección en las gónadas, si bien los resultados no fueron satisfactorios. La infección detectada en el fémur no permitía caracterizar correctamente al individuo, existiendo un alto número de falsos negativos (individuos infectados por *Wolbachia*, en cuyo fémur no fue posible detectar la infección). Este experimento, pese a no cumplir con las expectativas previstas, permitió confirmar la presencia de *Wolbachia* en el fémur de parte de estos organismos, si bien el alto número de falsos negativos, sugiere que las densidades bacterianas en esta parte del organismo podrían ser muy bajas.

La infección de los tejidos somáticos es muy importante a la hora de discutir la importancia que puede llegar a tener la transmisión horizontal mediada por parasitoides, y principalmente a la hora de evaluar la hipótesis de *dirty-needle* o “aguja sucia”, sugerida por Houck *et al.* (1991) en referencia a la transmisión de genes de *Drosophila sp.* mediante el ácaro semi-parásito *Proctolaelaps regalis* (ver sección “Transmisión horizontal de *Wolbachia* en *C. parallelus*” en los resultados, pág. 215 y su posterior discusión, pág. 319). En estos casos en los que un parasitoide puede infectarse tras entrar en contacto con un hospedador infectado, y transmitir posteriormente la infección a otros hospedadores a los que inyecte sus huevos (y viceversa), se requiere de altas densidades bacterianas en el tejido somático de los hospedadores. A su vez, destacar el trabajo de Frydman *et al.* (2006) sobre el papel que puede tener la infección en tejido somático actuando como reservorio de la infección.

Además, los estudios de la distribución de *Wolbachia* en tejido somático han revelado la presencia de este endosimbionte en el tejido nervioso de varios hospedadores, incluidos

*Nasonia* sp., *Rhodnius* sp. y *Drosophila* sp. (Espino *et al.*, 2009; Chafee *et al.*, 2011; Albertson *et al.*, 2013). Este hecho podría ser relevante para explicar los cambios comportamentales atribuidos a *Wolbachia*. Sin embargo, se trata de un campo de estudio muy reciente sobre el que hay muy pocos datos disponibles.

Respecto a la detección de *Wolbachia* sobre aplastados de testículo de saltamontes, la técnica, si bien no aporta la información estructural de las hibridaciones sobre tejido, puede resultar útil en algunos contextos. Por ejemplo, puede ser una alternativa a la detección por PCR en los casos en los que sólo se disponga de material fijado en etanol:acético. Sin embargo el protocolo de hibridación, incluyendo la incubación en el *buffer* modificado, supone una pérdida considerable de la calidad del material, quedando las células y núcleos muy deteriorados y dificultando su observación y análisis (ver resultados, apartado “Detección de *Wolbachia* mediante WCH en aplastados de testículo de saltamontes”, pág. 104).

Este efecto indeseado se ha paliado parcialmente evitando la presencia de SDS 10% en el *buffer* de hibridación, dado que la adición del detergente desestructuraba los tejidos y evitaba su correcta visualización. Pese a ello, la pérdida de morfología en la muestra hace que esta técnica limite su utilidad para detectar presencia/ausencia de la bacteria.

### **36.2 Aproximación a la localización del resto de la comunidad bacteriana de *C. parallelus* mediante WCH.**

Los experimentos realizados previamente, tanto el PCR-DGGE, como los posteriores análisis mediante PCR estándar, confirmaron una comunidad bacteriana limitada en las gónadas de *C. parallelus*. Dos endosimbiontes principales, *Wolbachia* y *Spiroplasma*, acompañados puntualmente por otras bacterias. Para confirmar estos datos y con fin de darles una visión citológica, se decidió analizar la distribución de estas bacterias en el propio tejido, utilizando para ello una modificación de la “*Whole Cell Hybridization*” puesta a punto para la detección de *Wolbachia* (Martínez *et al.*, 2009).

En este caso, se empleó, junto a las sondas específicas de *Wolbachia*, la sonda EU338 unida directamente a fluoresceína, empleada habitualmente para detectar la mayor parte de las especies conocidas de bacterias, al hibridar sobre una región muy conservada del 16s *rRNA* (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995; Gonella *et al.*, 2012). Esta sonda por tanto permitiría la detección de *Wolbachia*, *Spiroplasma* y cualquier otra bacteria presente en el tejido. Esta aproximación nos permitiría determinar la distribución conjunta de *Wolbachia* y *Spiroplasma*, a falta de una sonda específica para este último endosimbionte. Su validez proviene de que el



tejido reproductivo de estos organismos debería ser, salvo infección patológica, estéril, en donde sólo existiesen bacterias simbióticas con el organismo.

La distribución de *Wolbachia* es, tal y como se describió previamente (ver sección “Detección de *Wolbachia* mediante WCH en tejidos incluidos en parafina”, pág. 207), estrictamente citoplasmática y dispersa por el tejido reproductivo. Por otro lado, el estudio de PCR-DGGE apoya que *Spiroplasma* es el principal endosimbionte de *C. parallelus* tras *Wolbachia*, y que presenta también una distribución citoplasmática. Como consecuencia, esperaríamos que la mayoría de la señal detectada en el tejido de individuos no infectados por *Wolbachia* (pero infectados por *Spiroplasma*, según los resultados de PCR), se corresponda con este último endosimbionte. Obviamente, esta metodología es una aproximación y podría mejorarse si se desarrollara una sonda específica de *Spiroplasma*.

Ambos endosimbiontes tenían una distribución uniforme en el tejido (ver Fig. 73, Fig. 74 y Fig. 75), a modo de hibridaciones puntuales en el citoplasma. En este caso, *Wolbachia* podía ser detectada por la hibridación doble de las sondas roja y verde. La doble hibridación confirmó la especificidad de las hibridaciones previas (en las que aun se desconocía la existencia de otros endosimbiontes, y en las que una de las máximas preocupaciones era conocer si la hibridación era o no específica). Este experimento mostraba que en presencia de otros endosimbionte (conocidos tras los resultados de la PCR-DGGE) la sonda de *Wolbachia* era específica y en las condiciones testadas, capaz de distinguir entre bacterias. Asumiendo que la hibridación en verde (únicamente en verde) observada en individuos infectados por *Spiroplasma*, pertenece mayoritariamente a este endosimbionte, no se observaron diferencias notables en la distribución de la infección por *Wolbachia* y por *Spiroplasma*. Tampoco se observaba una exclusión competitiva de ambos endosimbiontes en regiones distintas del tejido.

La detección de *Spiroplasma* mediante esta metodología indirecta debe considerarse con precaución, siendo únicamente una aproximación. El futuro desarrollo de sondas específicas para *Spiroplasma* podría facilitarnos datos específicos sobre este endosimbionte. Aun así, al comparar estas muestras (infectadas por *Spiroplasma*) con otras no infectadas por este endosimbionte, observamos que las diferencias son relevantes. Aquellos organismos no infectados por *Wolbachia*, ni tampoco por *Spiroplasma*, presentan un número menor de puntos de hibridación (correspondientes previsiblemente a otras bacterias presentes en el tejido, presumiblemente las detectadas mediante DGGE-PCR, indicadas en el apartado “Detección de otros endosimbiontes mediante PCR-DGGE”, pág. 96), que contrasta con las hibridaciones previas, en las que se detectó un mayor número de señales. Esto podría apoyar esta



aproximación. Finalmente, el control mediante incubaciones con RNasa permitió descartar artefactos durante la hibridación (acúmulos de sonda, unión inespecífica de los anticuerpos...).

### **37     TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE *WOLBACHIA* EN *C. PARALLELUS*.**

Este estudio describe la interacción entre *C. parallelus* y dos especies de parasitoides, un nematomorfo (clase Gordioida) y un díptero, perteneciente a la familia Tachinidae (Dra. A. García-Moreno, com. pers.), así como la infección por *Wolbachia* de estos organismos y su implicación en posibles fenómenos de transmisión horizontal (Houck *et al.*, 1991; Boyle *et al.*, 1993; Schilthuizen & Stouthamer, 1997; Werren, 1997; Grenier *et al.*, 1998; Heath *et al.*, 1999; Vavre *et al.*, 1999; Noda *et al.*, 2001b; Haine *et al.*, 2005a; Russel & Moran, 2005).

Este punto es de crucial importancia dado que la transmisión horizontal de la explicación de la infección es vital para explicar los patrones globales de infección en artrópodos (Raychoudhury *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2009a), y concretamente el patrón de infección por el supergrupo B en *C. parallelus*. Sin embargo tasas altas de transmisión horizontal destruirían la estructuración de la infección en *C. parallelus*, y restarían importancia en poco tiempo al papel de *Wolbachia* en su dinámica. En el caso concreto del supergrupo B, hemos propuesto una expansión de la infección desde poblaciones del norte de Europa, sin embargo los datos muestran que si bien la infección parece ser capaz de atravesar la barrera de subespecie, su progresión en *Cpe* se ve frenada (bien por condicionantes ambientales, bien propios del hospedador, o bien por la interacción con las altas frecuencias de las cepas F en la población). Esto favorecería un escenario en el cual se mantuvieran los actuales patrones de infección, y por tanto las posibles incompatibilidades generadas por la infección diferencial por *Wolbachia*.

Uno de los elementos importantes a la hora de analizar la transmisión horizontal de *Wolbachia* en *C. parallelus*, es el sistema por el que se produce este traspaso. Una de las posibles vías de infección propuestas en la bibliografía son los parasitoides (Houck *et al.*, 1991; Schilthuizen & Stouthamer, 1997; Werren, 1997b; Dunn & Rigaud, 1998; Grenier *et al.*, 1998; Jochemsen *et al.*, 1998; Heath *et al.*, 1999a; Vavre *et al.*, 1999b; Noda *et al.*, 2001b; Hughes *et al.*, 2004). En el caso de *C. parallelus*, la detección de varios parasitoides asociados de forma recurrente a las poblaciones naturales de este ortóptero permitió la evaluación de esta vía de infección. En primera instancia valoraremos cuán frecuente es el parasitismo por ambos taxones en *C. parallelus*, para modular su importancia en la expansión de la infección. En segundo lugar discutiremos los datos que apoyan la infección *Wolbachia* en ambos taxones.



### 37.1 Familia Tachinidae.

Durante la disección de individuos de *C. parallelus* se detectó una especie de la familia Tachinidae. Este parásito afecta como media a un 3,43 % de los individuos de *C. parallelus*. Al igual que ocurría en el caso anterior, los datos muestran porcentajes dispares en relación al número de individuos infectados por estos parasitoides, si bien, en algunas poblaciones el fenómeno es considerable. Si analizamos la infección media a lo largo de los años destacan las poblaciones de Puerto Viejo 5 (población cuya infección por *Wolbachia* fue analizada en el marco de la tesis doctoral del Dr. J. Sarasa (2013)) con un 22% de los individuos infectados, o Puerto Cantó con un 16% de infectados. Estos datos sugieren la posible importancia que pueden tener estos fenómenos de parasitismo a la hora de valorar la transmisión horizontal en estos sistemas.

La variación de la incidencia de estos parasitoides a lo largo de los distintos años es estadísticamente significativa en varias poblaciones. Sin embargo, y dado que no existe un patrón de variación evidente, al igual que en el caso anterior, asumimos que se debe a la existencia de factores ambientales, así como de fenómenos aleatorios o intrínsecos a la propia interacción hospedador-parásito, incluyendo su sistema inmune, estado general de salud, etc. (Fig. 78).

Existen pocos estudios sobre la capacidad de infestación de este tipo de organismos, y suelen estar relacionados con la propuesta de ser usados como una posible herramienta de control biológico. De hecho, este sistema fue empleado con éxito en el control biológico de la polilla *Operophtera brumata*, en Canadá. Para ello se introdujo el tachínido *Cyzenis albicans* en poblaciones naturales de esta polilla, reduciéndose su densidad poblacional (Murdoch *et al.*, 1985). Pese a que esta estrategia fuese exitosa, generalmente la infestación por este parasitoide no supera normalmente el 5% de los hospedadores (Varley *et al.*, 1973). Esta incidencia es comparable con el nivel de parasitismo detectado en *C. parallelus*.

Un hecho a destacar es la preferencia aparente de los tachínidos por infestar individuos hembras de *C. parallelus* ( $p < 0,05$ ). Esto no sucedía en el caso de los nematomorfos. Esta preferencia podría estar relacionada con el dimorfismo sexual en *C. parallelus*, debido al mayor tamaño de las hembras. Esto facilitaría mayores recursos para las larvas en desarrollo, por lo que es posible que exista algún sistema de reconocimiento asociado al sexo del hospedador. Este tipo de comportamientos selectivos, por los cuales los parasitoides colonizan de forma preferencial un determinado sexo del hospedador, han sido descritos por ejemplo entre



*Homotrixa* sp. (Diptera: Tachinidae) y su hospedador *Sciarasaga quadrata* (Orthoptera: Tettigoniidae) (Allen, 1995). En este caso existe una preferencia por los machos de esta especie de Tetigónidos, asociada con la capacidad de los parasitoides para reconocer el canto de estos machos. Cabe destacar la capacidad a su vez para reconocer de forma preferencial aquel canto que a su vez prefieren la hembras de esa especie, por lo que los machos que atraen a más hembras, a su vez, atraen a más parasitoides (Wagner & Basolo, 2007; Martin & Wagner, 2010).

El parasitismo simultáneo de ambas especies de parasitoides (nematomorfos y dípteros) fue un fenómeno muy poco frecuente, incluso excepcional, lo que podría indicarnos la existencia de algún mecanismo que favorezca la exclusión entre ambas especies. Cabe destacar que en las poblaciones en las que existe un alto grado de parasitismo por nematomorfos, tales como Biescas y Busmayor, no se han detectado otros parasitoides (tales como los tachínidos) que habitualmente parasitan a *C. parallelus*. Este hecho respalda la competencia entre ambos parasitoides citada, que provoque que la presencia de una especie en altas proporciones dificulte la aparición de la otra. Se ha observado el caso contrario en poblaciones como Navafría, en las que la presencia de una alta incidencia de tachínidos va asociada a una ausencia de nematomorfos. En esta población existe un hábitat propicio para los nematomorfos, con zonas encharcadas y un arroyo que se mantiene durante todo el año, aunque no se han detectado individuos de este tipo. Pese a los datos disponibles, no podemos descartar que estas asociaciones sean casuales y responder a variables ambientales y demográficas que no estén relacionadas con las relaciones de coexistencia entre parásitos.

Aunque los niveles de infestación son similares en los dos clados de parasitoides afectando a *C. parallelus*, en comparación con el otro caso, el ciclo de vida de los tachínidos nos permite especular sobre su mayor importancia dentro de la dinámica del sistema en estudio. Primero en su condición de insectos voladores y cuyo radio de expansión es mucho mayor que el de *C. parallelus* (este último aproximadamente 30 m. por generación), y segundo, en relación a su sistema de reproducción. En el caso de que esta especie estuviese infectada por *Wolbachia*, como así parece, podría poner en contacto cepas bacterianas de poblaciones distantes. A su vez, en función de la especificidad de esta especie de tachínido frente a su hospedador, se podrían ver implicados varios taxones, en lo que se ha denominado “redes de transmisión” (Zug *et al.*, 2012).

## 37.2 Phylum Nematomorpha.



Es relativamente habitual detectar durante la disección de los individuos de *C. parallelus* un parasitoide del *Phylum* Nematomorpha, que se clasifica dentro de la clase Nematomorpha: Gordioida, dado que se trata de un nematomorfo de aguas dulces. Su clase hermana (Nematomorpha: Nectonematoida), únicamente incluye nematomorfos de vida marina y plantónica. El ciclo de estos organismos involucra formas de vida parásitas que se desarrollan en un hospedador artrópodo, como por ejemplo *C. parallelus*, así como formas de vida libre que se desarrollan en entornos acuáticos.

Se ha observado la aparición de este parásito en numerosas poblaciones de *C. parallelus*, tanto en *C. parallelus erythropus* como en *C. parallelus parallelus*, por lo que no parece que haya una relación entre subespecie y la presencia o ausencia de este organismo. Cabe destacar que, salvo excepciones, las poblaciones de *C. parallelus* suelen encontrarse en zonas cercanas a ríos, o zonas húmedas, con arroyos y zonas encharcadas (prados alpinos), por lo que esta especie de ortópteros supone un buen candidato para ser el hospedador habitual de estos parásitos. Lo que desconocemos, es si esta especie puede encontrarse asociada otras especies de ortópteros presentes en la zona, o bien si es especie-específico. Este aspecto de su biología puede tener relevancia a la hora de interpretar los fenómenos de transmisión horizontal como redes de transmisión entre especies (Zug *et al.*, 2012), más aun cuando se han detectado las mismas cepas que infectan a *C. parallelus* en ortópteros que comparten su hábitat (ver sección “Caracterización de la infección por *Wolbachia* en otras especies de ortópteros”, pág. 225).

Estudios realizados en distintas especies de la clase Gordioida indican que las infecciones múltiples son generalmente raras, entre un 8–18% de los hospedadores pueden presentar varios parásitos de un tipo concreto (Poulin, 1995; Thomas *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2012). En nuestro caso no se detectaron casos de multiparasitismo afectando a los nematomorfos, por lo que en todos los casos se consideró que existía un único individuo por hospedador.

Este parásito afecta como media a un 3.84% de los individuos de *C. parallelus*. Eliminando del estudio las dos poblaciones cuyo afectación es extrema (Biescas y Busmayor), la presencia media cae hasta valores del 1.32%. La variación de la incidencia de estos parasitoides a lo largo de los distintos años es notable, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en varias poblaciones. Dado que no se ha detectado un patrón de variación evidente, asumimos que dicha variación se debe, al igual que asumíamos en el caso de los tachínidos, a la existencia de factores bióticos y abióticos no controlables en este estudio, como pueden ser los factores ambientales, otros quizás inmunológicos, así como fenómenos aleatorios (Fig. 78). En el caso concreto de los nematomorfos, la capacidad de localizar a otros individuos durante su fase de reproducción en zonas amplias, puede suponer un cuello de botella para las poblaciones de estos organismos



(Hanelt *et al.*, 2012), condicionando quizás su abundancia en la siguiente generación. Un año más húmedo de lo habitual, con torrentes que lleven mucha agua, puede suponer un problema para estos organismos, que requieren pozas de aguas tranquilas, y de tamaño reducido para facilitar su encuentro y reproducción.

El *Phylum* Nematomorpha es poco conocido, y no hay muchos estudios que nos permitan comparar la incidencia de estos organismos en las poblaciones de hospedadores afectados. Por ejemplo Hanelt & Janovy (2003) estudiaron la capacidad de tres especies de nematomorfos *Gordius robustus*, *Paragovdus varius* y *Chordodes morgurii*, para infectar a distintos hospedadores en condiciones de laboratorio, exponiendo a dichos hospedadores (n=20) a entre 500-2000 larvas de los parasitoides. Como resultado, se obtuvieron valores muy variables de infección, desde el 0% hasta infecciones del 100% de los individuos (según la especie de hospedador). Si se distingue entre especies de nematomorfos, las infecciones medias para los distintos insectos testados fueron un 61% en el caso de *Gordius robustus*, un 58% en el caso de *Paragovdus varius* y un 71% en el caso de *Chordodes morgurii*. Globalmente un 63% de los insectos fueron infectados. La variación entre especies hospedadoras es destacable, como se ha indicado.

Estos datos son muy superiores a los valores de incidencia detectados en *C. parallelus*, sin embargo muy posiblemente constituyen una sobre-estimación de la capacidad real de estos organismos en condiciones naturales, debido a las condiciones óptimas para la infección que se favorecían en el desarrollo experimental propuesto (Hanelt & Janovy Jr, 2003).

Por otra parte, estos últimos autores describen la detección de cistos (estadios larvarios de este parasitoide) en 2 de las 8 larvas de *Callibaetis sp.* (Ephemeroptera) analizadas (25%), así como en 11 de los 24 adultos estudiados (45%). Si bien la muestra es muy limitada y tiene un error asociado muy alto, sugiere que en condiciones naturales posiblemente no se observen tasas cercanas al 100%, como se describe en condiciones de laboratorio. Por otra parte, debemos tener en cuenta que tasas tan altas de infección, sin duda, pondrían en peligro la supervivencia de la propia especie hospedadora, dado que estos fenómenos de parasitismo van asociados generalmente a la muerte y, antes de ello, como habitual, a la castración de los hospedadores.

En determinadas poblaciones de *C. parallelus* se ha detectado un elevado número de casos de parasitismo, como por ejemplo en Biescas o en la población Busmayor. Estas poblaciones no tienen características especiales, al menos aparentemente, con respecto a otras de *C. parallelus*, por lo que los motivos por los que estos parásitos son capaces de progresar en estas localizaciones con mayor éxito se desconocen. Dado que en ambos casos el tamaño



muestral es menor y los individuos se han obtenido en un único año, es posible que estemos observando desviaciones respecto a los valores normales de incidencia, fruto del error muestral, así como de un año especialmente húmedo, seco u otras condiciones puntuales. Sin embargo, dado que estos parásitos provocan la muerte del hospedador o cuanto menos su esterilidad, una afectación del 61% como en Busmayor, puede suponer un problema grave para la supervivencia a largo plazo de la población. Sin duda se trata de un caso extremo, pero no deben descartarse las posibles consecuencias que para esta población pueda tener este altísimo nivel de parasitismo.

### 37.3 Infección por *Wolbachia* en tachínidos.

Se ha detectado infección por *Wolbachia* en individuos de la familia Tachinidae infestando a individuos de *C. parallelus*. Previamente se había descrito la infección por *Wolbachia* en otro endoparásito perteneciente también a la familia Tachinidae, *Exorista sorbillans*. Este díptero parasita al gusano de seda, *Bombyx mori* (Puttegowda & Madhu, 2001; Puttaraju & Prakash, 2005; Guruprasad *et al.*, 2011a; Guruprasad *et al.*, 2011b). Concretamente, se ha detectado la infección por el supergrupo B.

La prioridad en el experimento fue evitar las contaminaciones entre el ADN del hospedador y el parasitoide. Para ello, en el caso de los tachínidos, se tomaron las mismas precauciones que en el caso anterior, esto es, lavado en etanol de los individuos, separación de las muestras... Aunque somos conscientes de que esta posibilidad no puede ser excluida totalmente, sin embargo, los datos experimentales permiten descartar en gran parte la posibilidad de contaminaciones entre muestras. En este sentido, deben tenerse en cuenta los casos en los que pese a que el hospedador está infectado por *Wolbachia*, no se ha detectado infección en su parasitoide asociado. Estas situaciones, al igual que ocurría con el estudio realizado por Duron & Gavotte (2007), apoyan que un procedimiento minucioso de disección permite evitar los falsos positivos en relación a la infección. Por otro lado, existen varios individuos en los que se observa el caso contrario: el hospedador no está infectado, pese a que se ha detectado infección en el parasitoide. Estos resultados garantizan que la detección de *Wolbachia* se debe a la infección por esta bacteria del parasitoide, y no puede ser consecuencia de una contaminación entre ambas muestras. Los controles realizados durante la PCR garantizan que dichos resultados no se deben a errores experimentales y la discrepancia en numerosas ocasiones entre la infección detectada en *Chorthippus*, frente a la detectada en

cada parasitoide concreto, corrobora que los resultados obtenidos no son fruto de una contaminación de las muestras.

Al igual que hicimos en el caso anterior, se procedió a la caracterización molecular de las cepas de *Wolbachia* que infectan a esta especie de tachínidos con el fin de determinar el origen más probable de la infección por *Wolbachia*. Para ello se procedió a amplificar y secuenciar los 5 genes propuestos en el MLST, así como el gen *wsp* en tres individuos obtenidos en distintas poblaciones de *C. parallelus*.

El primero de ellos fue muestreado en la población híbrida de Portalet. La amplificación del gen *16S rRNA* permitió caracterizarle como “infectado por el supergrupo B de *Wolbachia*”. A su vez, esta técnica permitió descartar la infección por *Wolbachia* en el hospedador en el que fue detectado. El segundo individuo procedía de la población híbrida pirenaica (pero ajena a la zona híbrida) de Puerto Cantó y estaba infectado por el supergrupo F de *Wolbachia*, al igual que su hospedador (en este caso no fue posible seleccionar un individuo cuyo hospedador no estuviese infectado). El tercero fue detectado en la población española de Sallent de Gállego y en un estudio previo, mediante la amplificación del gen *16S rRNA*, se caracterizó su infección por el supergrupo B. Su hospedador se había determinado como coinfectado. Debido a que existían diferencias en la infección de ambos individuos, se esperaba limitar las posibilidades de contaminación entre ambos.

El análisis de las secuencias obtenidas en este estudio permite establecer la relación filogenética entre las secuencias de *Wolbachia* detectadas en los parasitoides, y aquellas que previamente se habían caracterizado en *C. parallelus*.

En el caso del tachínido detectado en la población de Sallent de Gállego, los alelos detectados se correspondieron en todos los casos con otros detectados anteriormente en individuos *C. parallelus* en esta población. Por otra parte, en el individuo caracterizado en Soques, se detectó una cepa de *Wolbachia* muy similar a aquellas cepas pertenecientes al supergrupo F que infectan a *C. parallelus*. Solo en el caso del gen *ftsZ* de este mismo individuo, se detectaron 3 posiciones variables respecto al alelo H3. Finalmente, en el individuo caracterizado en la población de Portalet, se observaron alelos previamente caracterizados para los genes *coxA*, *ftsZ* y *fbpA*. Sin embargo, en el caso del gen *hcpA* se reveló un nuevo alelo muy similar al H5, pero que presentaba dos posiciones variables. El gen *gatB* no pudo ser caracterizado debido a la aparición de señales dobles en el cromatograma.

Como en el caso de los nematomorfos (ver más adelante) las cepas detectadas no son idénticas a las caracterizadas en *C. parallelus*, pero sí son en todos los casos las secuencias de *Wolbachia* más cercanas filogenéticamente a éstas. Por ello, nos ratificamos en que la



explicación más plausible es la existencia de transmisión horizontal entre ambas especies, si bien los datos disponibles no nos permiten identificar en qué sentido se ha producido este fenómeno.

Independientemente de la ruta de transmisión desde un punto de vista epidemiológico (vía parasito-hospedador, vía depredación, vía hábitat), la infección a nivel global por *Wolbachia* podría apoyar la existencia de redes de transmisión más o menos efectivas (Zug *et al.*, 2012). La transmisión horizontal mediada por parasitoides y hospedadores, podría ser un ejemplo de estas redes de transmisión. En el caso de *C. parallelus*, podría especularse sobre la posibilidad de que a partir de un hospedador común, la infección se transmitiese a un parasitoide, que a su vez, pudiera transmitirle la infección a otro hospedador. En el caso concreto de la familia Tachinidae, la idea de una red de transmisión se basa en que este díptero podría llevarse consigo restos de tejido somático del hospedador en el que introduce sus huevos, lo que podría favorecer la transmisión de la bacteria al siguiente individuo al que el parasitoide inoculara sus huevos. Esta idea está reflejada en la hipótesis “dirty-needle” (Houck *et al.*, 1991), propuesta para explicar la transmisión de genes de *Drosophila* mediante el ácaro semiparásito *Proctolaelaps regalis* (Feener & Donald, 1997). La detección de bacterias en el tejido somático del hospedador (Martínez *et al.*, 2009; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013b) parece apoyar esta vía alternativa de transmisión horizontal.

Un posible problema a la hora de analizar los fenómenos de transmisión horizontal como una red de transmisión (esto es, el hospedador transmite la infección a un parasitoide que a su vez la transmite a un nuevo hospedador) es que generalmente los parasitoides matan a sus hospedadores, tanto en el caso de la familia Tachinidae como aquellos pertenecientes al *Phylum* Nematomorpha, (Godfray, 1994; Soto, 2002; Soto & Ocampo, 2011). Esto provocaría que el hospedador “recién infestado” e “infestado” tuviera pocas probabilidades de transmitir la infección a la siguiente generación, salvo que el parasitoide no prosperara (gracias por ejemplo a mecanismos de defensa tales como la encapsulación de los huevos antes de que continúen con su desarrollo dentro del hospedador). En el caso de *C. parallelus*, aparentemente el parasitoide mata a su hospedador al emerger, pero incluso en aquellos casos en los que esto no ocurriera, el parasitoide castraría al individuo de *C. parallelus*, dado que los individuos parasitados carecen de gónada al diseccionarlos. Si bien no es descartable que los individuos puedan reproducirse durante las primeras etapas del desarrollo del parasitoide.

Hay opiniones encontradas sobre si la infección por *Wolbachia* presente en los huevos del parasitoide puede transmitirse al hospedador en los casos en los que los parasitoides no prosperen. Algunos autores apoyan que es poco probable que *Wolbachia* pudiese transmitirse desde el parasitoide encapsulado al hospedador (Hughes *et al.*, 2004). Otros autores sin



embargo apoyan que esta transmisión es posible. Por ejemplo, Hadfield & Axton (1999) detectaron que *Wolbachia* podía migrar entre el huevo del parasitoide hasta los tejidos circundantes. Los estudios de Dedeine *et al.*, (2001) también apoyan esta hipótesis, al menos en el caso de la avispa *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). Otros autores han demostrado el movimiento de *Wolbachia* desde el tejido somático a los tejidos reproductivos y los mecanismos celulares implicados (Ferree *et al.*, 2005; Frydman *et al.*, 2006).

Los datos de nuestro estudio en los que el origen de la infección del parasitoide debía provenir de la generación anterior, demuestran que en el caso de los parasitoides habituales de *C. parallelus*, *Wolbachia* ha sido capaz de superar, al menos, las primeras tres barreras necesarias para que la transmisión horizontal entre especies sea efectiva (Vavre *et al.*, 2009):

- (i) Contacto íntimo entre la especie infectada y aquella que será infectada.
- (ii) Adaptación a un nuevo entorno celular.
- (iii) Transmisión vertical efectiva en el nuevo hospedador.

Dado que desconocemos el umbral mínimo de infección en esta especie, no podemos afirmar si la infección se encuentra en el equilibrio, o bien va a incrementarse o desaparecer progresivamente. Esta última barrera a nivel poblacional posiblemente es la más complicada de superar, cuando los niveles iniciales de infección son bajos, como es el caso de la infección, tanto en los tachínidos como en los nematomorfos. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos por los cuales la infección podría progresar a nivel poblacional, tanto procesos estocásticos, como debido a cuellos de botella, selección, etc. (Shoemaker *et al.*, 2002).

Todas estas barreras implican que si bien la transmisión horizontal no es imposible, y de hecho puede probarse desde un punto de vista filogenético (Bouchon *et al.*, 1998; Vavre *et al.*, 1999c; Cordaux *et al.*, 2001), también es un proceso complejo, difícil y raramente exitoso, como muestran los estudios de transfección (Heath *et al.*, 1999b; Rigaud *et al.*, 2001). Sin embargo, esta visión cambia desde un punto de vista evolutivo, bajo el que este fenómeno raro puede llegar a suceder tras millones de años de intentos fallidos. Su éxito o fracaso en el caso de *C. parallelus* es impredecible a día de hoy, debido a que la aparición y posterior desaparición de la infección por *Wolbachia* en un hospedador es un fenómeno habitual en la naturaleza (Shoemaker *et al.*, 2002), pero puede apoyar la capacidad de esta bacteriana para transmitirse, incluso entre *Phyla* distintos y el potencial de este tipo de fenómenos para explicar la actual infección por *Wolbachia* a nivel global (Zug *et al.*, 2012).



### 37.4 Infección por *Wolbachia* en nematomorfos.

Con el fin de detectar otra posible vía de transmisión horizontal, se ha analizado la infección por *Wolbachia* en individuos de la clase Gordioidea (Nematomorpha), detectados durante la disección de su hospedador habitual *C. parallelus*. Cabe destacar la detección de la infección por *Wolbachia* en este *Phylum* de nematomorfos en el que hasta el momento no había sido detectada (Duron & Gavotte, 2007; Hudson & Floate, 2009; Hanelt *et al.*, 2012), si bien los estudios realizados hasta el momento están restringidos a un reducido número de especies y es esperable que aparezcan más casos en un futuro.

Una crítica frecuente en los estudios sobre transmisión horizontal es la posibilidad de que exista una contaminación cruzada entre las muestras del parasitoide y el hospedador. En un trabajo previo, Noda *et al.* (2001b) describieron un posible fenómeno de transmisión horizontal entre un insecto hoja (Homoptera: Delphacidae) y su endoparásito (Strepsiptera: Elenchidae) en base a la relación filogenética de las cepas de *Wolbachia* que infectaban a hospedador y parasitoide. Sin embargo, Hughes *et al.* (2004) puntualizaron tres años después que compartir la misma cepa de *Wolbachia* entre hospedadores y su parasitoide común, no necesariamente significaba que estuviéramos observando un fenómeno de transmisión horizontal. Sus argumentos se basaban en que compartir una determinada cepa de *Wolbachia* puede estar relacionada con el contacto íntimo entre ambas especies y no necesariamente suponer un caso efectivo de transmisión horizontal. En el caso de los parasitoides del orden Strepsiptera analizado por Noda *et al.* (2001b), la propia anatomía del parasitoide en su fase adulta podría favorecer que la infección detectada en esta especie no fuese fruto de una infección real, sino que fuesen trazas de la infección del hospedador. Concretamente, Hughes *et al.* (2004) se referían a que en estado adulto, este orden de insectos carece de boca o estómago, y que la absorción de nutrientes se realiza a través de una estructura denominada “apron” (Kathirithamby, 2000). Generalmente se considera que *Wolbachia* no sobreviviría al tracto intestinal de los parasitoides, por lo que en los casos en los que las larvas de los parasitoides o sus individuos adultos presentaran infección por *Wolbachia*, ésta no debería ser una consecuencia de las trazas de la infección en sus aparatos digestivos (Johanowicz & Hoy, 1996; Cordaux *et al.*, 2001). Sin embargo, esta barrera química no existiría en el caso del orden Strepsiptera, dado que el “apron” no constituiría una barrera a este nivel (Hughes *et al.*, 2004).

En el caso de *C. parallelus* y sus parasitoides nuestra máxima precaución fue evitar a toda costa las contaminaciones entre el ADN del hospedador y el parasitoide, como ya hemos indicado anteriormente. Para ello, durante la disección el parasitoide fue separado

cuidadosamente y dispuesto en un tubo eppendorf estéril que contenía etanol absoluto. Esperábamos que el lavado en etanol minimizara la posibilidad de que existan restos del tejido del hospedador en esta muestra (metodología respaldada *a posteriori* por los resultados experimentales). Aunque la posibilidad de contaminación cruzada no puede ser excluida totalmente, los estudios de Duron & Gavotte (2007), expuestos a continuación, a su vez avalaban la metodología empleada.

El caso del posible fenómeno de transmisión horizontal entre el insecto hoja (Homoptera: Delphacidae) y su endoparásito (Strepsiptera: Elenchidae), hace plantearnos que un conocimiento pleno del ciclo de vida y la biología de los hospedadores puede ser fundamental para interpretar correctamente la existencia de fenómenos de transmisión horizontal. Debido a su estilo de vida parásito, el estómago de los nematomorfos es en gran medida no funcional, y los juveniles absorben materiales directamente de su hospedador (Inoue, 1959; Kirjanova, 1959; Rajaram & Rajulu, 1975a). Pese a que por tanto el estómago de los nematomorfos no sea una barrera química 100% eficaz, caben destacarse los estudios previos en nematomorfos realizados por Duron & Gavotte (2007). En este experimento se analizaron varios nematomorfos que infestaban a dos especies de hospedadores. Ambos organismos, *Nemobius sylvestris* (Orthoptera, Gryllidae) y *Pholidoptera griseoptera* (Orthoptera, Tettigoniidae), estaban infectados por el supergrupo B de *Wolbachia*, pese a lo cual no se detectó la presencia de *Wolbachia* en los parasitoides. Este resultado mostró que un proceso estándar de disección, permitía evitar la contaminación de las muestras y como consecuencia falsos positivos en los nematomorfos (siempre y cuando se tomen las precauciones habituales (uso de material estéril, separación de las muestras...)). A su vez, sus resultados negativos apoyan que pese a que un hospedador esté infectado, la bacteria no debería aparecer en el nematomorfo diseccionado como consecuencia de su relación alimentaria. Debido a ello, dudamos que la infección por *Wolbachia* detectada en los nematomorfos encontrados en *C. parallelus* se corresponda con trazas del ADN del hospedador, si bien consideramos que las críticas de Hughes *et al.* (2004) deben tenerse en cuenta para evitar falsos positivos.

A su vez, los datos experimentales obtenidos en *C. parallelus* permiten descartar en gran medida la posibilidad de contaminaciones entre muestras, observándose casos en los que pese a que el hospedador está infectado por la bacteria, el parasitoide estudiado no presenta infección. También observamos el caso contrario, en el que el hospedador no está infectado, pese a que se ha detectado infección en el parasitoide. Estos resultados avalan que la detección de *Wolbachia* se debe a la infección del parasitoide por esta bacteria, y no a

consecuencia de una contaminación entre ambas muestras. Los controles realizados durante la PCR a su vez garantizan que no existe error experimental en dicha detección. En este sentido destacar los casos de tipo (I) o (II) (Fig. 80) en los que la infección por *Wolbachia* no pueda achacarse a posibles contaminaciones entre hospedador y parasitoide, tanto a nivel experimental como a que esta infección pudieran ser trazas de la infección del hospedador motivadas por la propia alimentación del parasitoide. Estas situaciones refuerzan la hipótesis de que tras un contacto íntimo, la infección por *Wolbachia* puede prosperar en el parasitoide y transmitirse a la siguiente generación, punto crítico a la hora de afirmar que puedan existir fenómenos de transmisión horizontal efectiva entre especies (aparte de la difusión de la infección entre distintos hospedadores en la misma generación, ya citada). Sin descartar la transmisión horizontal del parasitoide al hospedador.

Se deben destacar los casos detectados en los que:

- (i) El hospedador y parasitoide estén infectados de forma diferencial por *Wolbachia*.
- (ii) El hospedador no esté infectado por la bacteria, mientras que su parasitoide sí lo esté, o viceversa. Esto puede indicar la extrema dificultad para la bacteria de traspasar las distintas barreras e incompatibilidades existentes a lo largo de este proceso de transmisión horizontal (conseguir un contacto íntimo, adaptarse a un nuevo entorno celular, transmitirse de forma eficiente a la nueva generación y superar el umbral de infección necesario para prosperar a nivel poblacional).

Para corroborar que existe un origen común en la infección por *Wolbachia* en los nematomorfos y *C. parallelus*, se procedió a la caracterización molecular de las cepas de *Wolbachia* que infectan a estos parasitoides. Para ello se amplificaron y secuenciaron los 5 loci propuestos en el MLST, así como el gen *wsp*. Se seleccionaron para esta parte del estudio 2 individuos. El primero de ellos procedía de la población española, pirenaica, de Escarrilla, y el estudio previo mediante la amplificación del gen *16S rRNA* mostraba su infección por el supergrupo F. Su hospedador se había caracterizado como “no infectado”, por lo que se evitaba la contaminación entre ambas muestras. El segundo individuo, infectado por el supergrupo B de *Wolbachia*, procedía de la población alpina italiana de Valdieri. En esta ocasión no fue posible seleccionar un individuo cuyo hospedador no estuviese infectado. En el caso concreto de los genes *ftsZ* y *fbpA*, dispusimos de un tercer individuo, muestreado en C. Tourmont (Pirineos franceses), y que estaba infectado por el supergrupo B.



El análisis de las secuencias obtenidas permitió establecer la estrecha relación filogenética entre las cepas de *Wolbachia* presentes en *C. parallelus*, y aquellas que infectan a estos nematomorfos. En el caso del parasitoide detectado en la población de Escarrilla, los alelos caracterizados se correspondieron con los alelos F detectados anteriormente en *C. parallelus* en esta población ibérica. Destacar sin embargo, la existencia de algunas posiciones variables en los genes *ftsZ* (una posición variable respecto al alelo H5), y *gatB* (una posición variable respecto al alelo H4).

Por otra parte, en el individuo analizado de Valdieri, se detectó una cepa de *Wolbachia* muy similar a aquellas cepas pertenecientes al supergrupo B que infectan a poblaciones europeas de *C. parallelus*. Sin embargo, deben mencionarse las variantes en el alelo H1 del gen *ftsZ* (1 posición variable) y en el gen *gatB*, donde se observaron 3 posiciones variables respecto al alelo H1. Debemos destacar el caso del gen *fbpA* en este individuo, dado que la secuencia obtenida no se correspondía con ninguno de los alelos previamente caracterizados en *C. parallelus*. De hecho, las secuencias más cercanas filogenéticamente son aquellas detectadas en otros parasitoides, en este caso avispas parásitas, así como en varios lepidópteros (*Trichogramma brassicae*, *Tetrastichus coeruleus*, *Ostrinia scapularis*, *Libythea myrrha* o *Anthene emolus*).

Estos datos apoyan la hipótesis de que ambas infecciones por *Wolbachia* tengan un origen común, independientemente de la direccionalidad. En general, la detección de cepas idénticas o muy similares de *Wolbachia* infectando a dos especies no relacionadas ha sido el principal argumento para apoyar la existencia de fenómenos de transmisión horizontal entre ambas (Werren *et al.*, 1995; Schilthuizen & Stouthamer, 1997; van Meer *et al.*, 1999; Vavre *et al.*, 1999; Haine *et al.*, 2005; Vavre *et al.*, 2009). Sin embargo, gran parte de estos estudios se realizaron utilizando como marcadores un único gen, y asumiendo que no existía recombinación entre cepas. Hoy sabemos que esta asunción debe tomarse con precauciones, dado que los casos de recombinación entre cepas pueden ser más frecuentes de lo que inicialmente se pensaba (Werren & Bartos, 2001; Reuter & Keller, 2003; Baldo *et al.*, 2005; Verne *et al.*, 2007; Weinert *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2011). El uso de varios marcadores, como por ejemplo en este estudio, permite obtener datos más fiables a la hora de caracterizar y comparar cepas bacterianas (Haine *et al.*, 2005).

En nuestro caso, si bien las cepas detectadas no son idénticas, el número de mutaciones respecto a los alelos más cercanos es mínimo. En todos los casos, los alelos caracterizados en *Chorthippus parallelus* son las secuencias de *Wolbachia* más cercanas filogenéticamente caracterizadas hasta el momento. Es por esto, que la explicación mas plausible es la existencia



de transmisión horizontal entre ambas especies. La aparición de mutaciones puntuales respecto a los alelos originales es habitual en otros casos de transmisión horizontal caracterizados a nivel molecular, y generalmente se han explicado como consecuencia de las presiones selectivas tras el proceso de transmisión horizontal (Haine *et al.*, 2005b). Sin embargo, la presencia de un alelo para el gen *fbpA* tan distinto respecto a las secuencias caracterizadas en *Chorthippus*, no es habitual. Dado que se trata de una secuencia detectada previamente en otros parasitoides, es posible que pueda reflejar procesos de transmisión horizontal de genes entre cepas bacterianas distintas, que potencialmente puedan estar en contacto en un mismo hospedador.

Se ha descrito la presencia de otros parasitoides en *C. parallelus*, tales como *Blaesoxipha laticornis* (Diptera, familia Sarcophagidae) (Marshall & Haes, 1988) y que si bien no se han detectado durante nuestro estudio, es posible que se trate de parasitoides generalistas, entre cuyos hospedadores se encuentre *Chorthippus parallelus*. A su vez, se sabe que muchos tachínidos pueden infestar a múltiples familias de ortópteros y otros órdenes de insectos, incluidos dermápteros (Philips, 1983), que a su vez pueden sufrir el hiperparasitismo de ciertas avispas parásitas (Himenoptera: Chalcidae) (Marshall & Haes, 1988). Este fenómeno, plantea un escenario a modo de “red de transmisión” que puede tener gran influencia en los procesos de transferencia que expliquen la actual infección por *Wolbachia* a nivel global (Zug *et al.*, 2012).

La existencia de transmisión horizontal de *Wolbachia* entre *C. parallelus* y un nematomorfo es especialmente relevante al tratarse de un fenómeno entre dos *Phyla* distintos. Generalmente se ha propuesto que este tipo de procesos es más fácil entre especies relacionadas, debido a que la bacteria tendría que adaptarse a unas condiciones celulares parecidas. Sin embargo, la plasticidad de *Wolbachia* para adaptarse a distintos entornos resulta suficiente para permitir este salto entre *Phyla*.

## CONCLUSIONES.

- (i) Se observan diferencias notables en las frecuencias de infección por los supergrupos F y B de *Wolbachia* en las distintas poblaciones de *C. parallelus* analizadas, tanto en la Península Ibérica, como en el resto de las localizaciones europeas muestreadas. La caracterización de estas poblaciones apoya a grandes rasgos la estructuración poblacional propuesta anteriormente, observándose un gradiente norte-sur a lo largo de la zona híbrida pirenaica.
- (ii) Las frecuencias de infección en las poblaciones analizadas son estables a corto plazo, detectándose cambios erráticos en ellas que no indican una tendencia clara. Las simulaciones matemáticas basadas en las poblaciones de Escarrilla y Gabas (zona híbrida pirenaica) permiten determinar un rango amplio de parámetros en los cuales la infección actual podría mantenerse a largo plazo.
- (iii) La infección por *Wolbachia* puede variar a lo largo del ciclo de vida del hospedador. Concretamente se ha observado una disminución de los niveles de coinfección en los machos de *C. parallelus* en la población de Navafría del Sistema Central ibérico. Esta disminución de la infección puede asociarse a múltiples causas, si bien nuestras evidencias apuntan a un efecto de la alta temperatura.
- (iv) Este declive en los niveles de coinfección tiene consecuencias en la dinámica de la infección a largo plazo, y puede ralentizar el incremento de las frecuencias de coinfección en la Península Ibérica.
- (v) El MLST permite la caracterización de al menos 33 ST diferentes en *C. parallelus*, agrupadas en 5 complejos ST.
- (vi) Las filogenias realizadas en base al gen *16S rRNA*, así como a los *loci* integrantes del MLST, permiten caracterizar a las cepas detectadas de *Wolbachia* como adscritas al supergrupo F, al supergrupo B o recombinantes.
- (vii) Existe una asociación clara entre las cepas de *Wolbachia* detectadas, y las poblaciones de *C. parallelus* en las que han sido caracterizadas. La divergencia entre las distintas cepas apoya un origen ancestral del supergrupo F, que habría co-divergido con *C. parallelus*, frente a un origen más reciente de la cepa B, potencialmente asociado a transmisión horizontal.
- (viii) Gran parte de los eventos de recombinación detectados en las cepas bacterianas, así como la aparición de alelos raros, coinciden espacialmente con las poblaciones híbridas



cercanas a Portalet. Esto podría estar asociado a la interacción entre ambos genomas híbridos (el bacteriano, y el del ortóptero), y su coevolución.

- (ix) El origen de la infección apoya el papel de *Wolbachia* en la formación de la zona híbrida, interaccionando con las incompatibilidades genómicas generadas por la divergencia en alopatría de ambas subespecies.
- (x) La comunidad bacteriana asociada a la gónada de *C. parallelus* es relativamente baja. Junto con *Wolbachia*, destaca la presencia de *Spiroplasma*. Este último endosimbionte bacteriano está presente en múltiples poblaciones de *C. parallelus*, si bien su presencia no parece influir en las frecuencias de la infección por *Wolbachia*. Nuestros datos descartan que pueda actuar induciendo la muerte selectiva de los machos, como ocurre en otros sistemas.
- (xi) Tanto *Wolbachia* como otros endosimbiontes detectados (incluyendo *Spiroplasma*) pueden ser detectados en los tejidos de mediante WCH. Su distribución es citoplasmática. La hibridación fue homogénea en todos los tejidos analizados.
- (xii) Se ha observado infección por los supergrupos F y B de *Wolbachia* en dos especies de parasitoides asociados a *C. parallelus*. Un tachínido y un nematomorfo. Esto apoya posibles eventos de transmisión horizontal entre taxones, mediados por parasitoides.
- (xiii) En base a estos datos, sugerimos un papel relevante para *Wolbachia* en la actual configuración de la zona híbrida, siendo un factor adicional a tener en cuenta a la hora de entender su dinámica y evolución.



## CONCLUSIONS.

- (i) We observe significant differences in F and B *Wolbachia* infection in the populations of *Chorthippus parallelus*, sampled from the Iberian Peninsula and other European regions. The infection distribution reinforces the previous data, revealing a gradient in infection frequency from north to south populations through the Pyrenean hybrid zone.
- (ii) Infection frequencies in the analyzed populations are stable in the short-term. We detect erratic changes in them without a clear tendency. Mathematical simulations based on the current frequencies populations from Escarrilla and Gabas (Pyrenean hybrid zone) show a wide range of parameters values, under which, the current frequencies would be maintained.
- (iii) *Wolbachia* infection varies during the host life cycle. In particular, we have observed a reduction in coinfection frequencies with age in males of *C. parallelus* from the Navafria population of the Iberian Sistema Central. This effect could have multiple explanations, but our evidence points towards the high temperature experienced by this population.
- (iv) This co-infection reduction has an important consequence for the in long-term dynamics of the infection. It could counteract the increase of co-infection in the Iberian Peninsula.
- (v) The MLST allows us to detect at least 33 STs in *C. parallelus*, falling into five ST-complexes.
- (vi) Phylogenies based on 16S rRNA gene and MLST, allow us to classify the *Wolbachia* strains as belonging to F or B supergroups, and some of them as recombinants.
- (vii) There is an association between the *Wolbachia* strains detected and the *C. parallelus* populations from which they originated. The divergence among strains supports an ancient origin of the F strain infection, followed by host-bacterial co-divergence. By contrast, the B strains infection of *C. parallelus* seems of recent origin, and may be associated with horizontal transmission from other species.
- (viii) There is a spatial coincidence between most of the detected recombination events in *Wolbachia*: the recombinant bacterial alleles occur in hybrid grasshopper hosts. This suggests an interaction between two hybrid genomes: the bacterial, and the orthopteroid and their coevolution.
- (ix) The proposed origin of the infection supports the proposition that *Wolbachia* had a role in the origin of the hybrid zone. These bacteria could interact with the other genomic incompatibilities generated after the allopatric divergence of the two subspecies of grasshopper.



- (x) The bacterial communities associated with *C. parallelus* gonad are depauperate. Together with *Wolbachia*, *Spiroplasma* is the main endosymbiont. *Spiroplasma* infects several populations of *C. parallelus*. However, it does not appear to affect *Wolbachia* frequencies. In addition, in our system we have been able to rule out some *Spiroplasma*-induced phenotypes that appear in other insects, including male killing.
- (xi) *Wolbachia* and other endosymbionts (including *Spiroplasma*) have been detected in the *C. parallelus* tissues by WCH. They have a cytoplasmatic distribution. The distribution of the endosymbionts appeared to be homogeneous throughout the tissues analysed.
- (xii) We have observed F and B *Wolbachia* infection in two parasitoids associated with *C. parallelus*: a tachinid and a nematomorph. This result supports the proposition that horizontal transmission events could be mediated by these parasitoids.
- (xiii) Based on our data, we suggest that *Wolbachia* plays a significant role in the hybrid zone of *C. parallelus*. This bacterium is an additional factor, which should be accounted for, to understand the dynamics and evolution of the hybrid zone.

# BIBLIOGRAFÍA.

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J.W., Baird, S.J.E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C.A., Buggs, R., Butlin, R.K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S.H., Hermansen, J.S., Hewitt, G., Hudson, A.G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Möst, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A.W., Parisod, C., Pfennig, K., Rice, A.M., Ritchie, M.G., Seifert, B., Smadja, C.M., Stelkens, R., Szymura, J.M., Väinölä, R., Wolf, J.B.W. & Zinner, D. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **26**: 229-246.
- Achtman, M. 1998. A phylogenetic perspective on molecular epidemiology. In: *Molecular Medical Microbiology*. M. Sussman, ed. Academic Press, London, UK.
- Adamo, S.A. 1998. The specificity of behavioral fever in the cricket *Acheta domesticus*. *Journal of Parasitology* **84**: 529-533.
- Agencia Estatal de Meteorología de España 2011. *Atlas climático ibérico. Temperatura del aire y precipitación (1971-2000)*. Departamento de Producción de la Agencia Estatal de Meteorología de España (Área de Climatología y Aplicaciones Operativas) e Instituto de Meteorología de Portugal (Divisão de Observação Meteorológica e Clima).
- Ahmed, M.Z., Ren, S.-x., Xue, X., Li, X.-X., Jin, G.-h. & Qiu, B.-L. 2010. Prevalence of endosymbionts in *Bemisia tabaci* populations and their in vivo sensitivity to antibiotics. *Current Microbiology* **61**: 322-328.
- Aires de Sousa, M., Bartzavali, C., Spiliopoulou, I., Santos Sanches, I., Crisóstomo, M.I. & de Lencastre, H. 2003. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a University Hospital in Patras, Greece. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 2027-2032.
- Akaike, H. 1973. Information theory as an extension of the maximum likelihood principle. In: *Second International Symposium on Information Theory* (B. Petrov & F. Csaki, eds), pp. 267-281. Akademiai Kiado.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**: 716-772.
- Aksoy, S. & Rio, R.V.M. 2005. Interactions among multiple genomes: Tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 691-698.
- Albertson, R.J., Tan, V., Leads, R.R., Reyes, M., Sullivan, W. & Casper-Lindley, C. 2013. Mapping *Wolbachia* distributions in the adult *Drosophila* brain. *Cellular Microbiology*. doi: 10.1111/cmi.12136.
- Alfaro, M.E. & Holder, M.T. 2006. The posterior and the prior in bayesian phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37**: 19-42.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Allen, G.R. 1995. The biology of the phonotactic parasitoid, *Homotrixa* sp. (Diptera: Tachinidae), and its impact on the survival of male *Sciarasaga quadrata* (Orthoptera: Tettigoniidae) in the field. *Ecological Entomology* **20**: 103-110.
- Amann, R.L., Krumholz, L. & Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770.
- Amann, R.L., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.

- Anbutsu, H. & Fukatsu, T. 2003. Population dynamics of male-killing and non-male-killing *Spiroplasmas* in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1428-1434.
- Anbutsu, H. & Fukatsu, T. 2006. Tissue-specific infection dynamics of male-killing and nonmale-killing *Spiroplasmas* in *Drosophila melanogaster*. *Fems Microbiology Ecology* **57**: 40-46.
- Anbutsu, H., Goto, S. & Fukatsu, T. 2008. High and low temperatures differently affect infection density and vertical transmission of male-killing *Spiroplasma* symbionts in *Drosophila* hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 6053-6059.
- Anbutsu, H. & Fukatsu, T. 2010. Evasion, suppression and tolerance of *Drosophila* innate immunity by a male-killing *Spiroplasma* endosymbiont. *Insect Molecular Biology* **19**: 481-488.
- Anbutsu, H. & Fukatsu, T. 2011. *Spiroplasma* as a model insect endosymbiont. *Environmental Microbiology Reports* **3**: 144-153.
- Anderson, E., ed. 1949. *Introgressive Hybridization*. John Wiley & Sons, New York.
- Anderson, E. & Stebbins, G.L. 1954. Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* **8**: 378-388.
- Andrews, T.D. & Gojobori, T. 2004. Strong positive selection and recombination drive the antigenic variation of the Pile protein of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genetics* **166**: 25-32.
- Arnaud, P. 1978. *A Host-parasite catalog of North American Tachinidae (Diptera)*. Science and Education Administration, California Academy of Sciences, United States.
- Augustinos, A.A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A.F., Borges, P.A.V., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G. & Bourtzis, K. 2011. Detection and Characterization of *Wolbachia* infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled? *Plos One* **6**: e28695.
- Baldauf, S. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics* **19**: 345-351.
- Baldo, L., Bartos, J.D., Werren, J.H., Bazzocchi, C., Casiraghi, M. & Panelli, S. 2002. Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts? *Parassitologia* **44**: 179-187.
- Baldo, L., Lo, N. & Werren, J.H. 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology* **187**: 5406-5418.
- Baldo, L., Bordenstein, S., Wernegreen, J.J. & Werren, J.H. 2006a. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 437-449.
- Baldo, L., Hotopp, J.C.D., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., Hayashi, C., Maiden, M.C.J., Tettelin, H. & Werren, J.H. 2006b. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7098-7110.
- Baldo, L., Prendini, L., Corthals, A. & Werren, J.H. 2007. *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. *Current Microbiology* **55**: 367-373.
- Baldo, L. & Werren, J.H. 2007. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: Spurious lineages and discordance with MLST. *Current Microbiology* **55**: 81-87.
- Baldo, L., Ayoub, N.A., Hayashi, C.Y., Russell, J.A., Stahlhut, J.K. & Werren, J.H. 2008. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Molecular Ecology* **17**: 557-569.
- Ballard, J.W.O., Hatzidakis, J., Karr, T.L. & Kreitman, M. 1996. Reduced variation in *Drosophila simulans* mitochondrial DNA. *Genetics* **144**: 1519-1528.
- Barluenga, M., Stölting, K.N., Salzburger, W., Muschick, M. & Meyer, A. 2006. Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature* **439**: 719-723.
- Barton, N.H. 1979. Gene flow past a cline. *Heredity* **43**: 333-339.



- Barton, N.H. & Hewitt, G.M. 1981. A chromosomal cline in the grasshopper *Podisma pedestris*. *Evolution* **35**: 1008-1018.
- Barton, N.H. 1983. Multilocus clines. *Evolution* **37**: 454-471.
- Barton, N.H., Halliday, R.B. & Hewitt, G.M. 1983. Rare electrophoretic variants in a hybrid zone. *Heredity* **50**: 139-146.
- Barton, N.H. & Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-148.
- Barton, N.H., Derek, E., Briggs, E., Eisen, J., Goldstein, D. & NH., P. 2007. *Evolution*. CSHL Press, UK.
- Barton, N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* **10**: 551-568.
- Bateson, W. 1909. Heredity and variation in modern lights. *Darwin and Modern Science*: 85-81.
- Batista, P.D., Keddie, B.A., Dosdall, L.M. & Harris, H.L. 2010. Phylogenetic placement and evidence for horizontal transfer of *Wolbachia* in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid, *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Canadian Entomologist* **142**: 57-64.
- Baudry, E., Bartos, J., Emerson, K., Whitworth, T. & Werren, J.H. 2003. *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Molecular Ecology* **12**: 1843-1854.
- Bella, J.L., Hewitt, G.M. & Gosálvez, J. 1990. Meiotic Imbalance In Laboratory-produced Hybrid Males of *Chorthippus-parallelus-parallelus* and *Chorthippus-parallelus-erythropus*. *Genetical Research* **56**: 43-48.
- Bella, J.L., Butlin, R.K., Ferris, C. & Hewitt, G.M. 1992. Asymmetrical homogamy and unequal sex-ratio from reciprocal mating-order crosses between *Chorthippus parallelus* subspecies. *Heredity* **68**: 345-352.
- Bella, J.L., Serrano, L., Hewitt, G.M. & Gosálvez, J. 1993. Heterochromatin Heterogeneity and Rapid Divergence of the Sex-chromosomes In *Chorthippus parallelus parallelus* and *C.p.erythropus* (Orthoptera). *Genome* **36**: 542-547.
- Bella, J.L., Serrano, L., Orellana, J. & Mason, P.L. 2007. The origin of the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 568-576.
- Bella, J.L., Martínez-Rodríguez, P., Arroyo-Yebras, F., Bernal, A., Sarasa, J., Fernández-Calvín, B., Mason, P.L. & Zabal-Aguirre, M. 2010. *Wolbachia* Infection in the *Chorthippus parallelus* Hybrid Zone: Evidence for Its Role as a Reproductive barrier. *Journal of Orthoptera Research* **19**: 205-212.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrach, I., Lipman, D.J., Ostell, J. & Wheeler, D.L. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research* **36**: D25-D30.
- Bentley, J.K., Veneti, Z., Heraty, J. & Hurst, G.D.D. 2007. The pathology of embryo death caused by the male-killing *Spiroplasma* bacterium in *Drosophila nebulosa*. *Bmc Biology* **5**: 9.
- Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* **21**: 163-193.
- Berticat, C., Rousset, F., Raymond, M., Berthomieu, A. & Weill, M. 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **269**: 1413-1416.
- Bierne, N., Welch, J., Loire, E., Bonhomme, F. & David, P. 2011. The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology* **20**: 2044-2072.
- Bigelow, R.S. 1965. Hybrid zones and reproductive isolation. *Evolution* **19**: 449-458.
- Bimova, B.V., Macholan, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Dufkova, P., Laukaitis, C.M., Karn, R.C., Luzynski, K., Tucker, P.K. & Pialek, J. 2011. Reinforcement selection acting on the European house mouse hybrid zone. *Molecular Ecology* **20**: 2403-2424.
- Biron, D.G., Ponton, F., Marché, L., Galeotti, N., Renault, L., Demey-Thomas, E., Poncet, J., Brown, S.P., Jouin, P. & Thomas, F. 2006. 'Suicide' of crickets harbouring hairworms: a proteomics investigation. *Insect Molecular Biology* **15**: 731-742.

- Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L. & Quillet, L. 2012. Variable copy number, Intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA Gene in *Pseudomonas*. *Plos One* **7**: e35647.
- Bojesen, A.M., Christensen, H., Nielsen, O.L., Olsen, J.E. & Bisgaard, M. 2003. Detection of *Gallibacterium* spp. in Chickens by Fluorescent 16S rRNA *In Situ* Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 5167-5172.
- Boni, M., Posada, D. & Feldman, M. 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* **176**: 1035-1047. .
- Bordenstein, S.R. & Werren, J.H. 1998. Effects of A and B *Wolbachia* and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in *Nasonia*. *Genetics* **148**: 1833-1844.
- Bordenstein, S.R. & Werren, J.H. 2000. Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? *Heredity* **84**: 54-62.
- Bordenstein, S.R., Uy, J.J. & Werren, J.H. 2003. Host genotype determines cytoplasmic incompatibility type in the haplodiploid genus *Nasonia*. *Genetics* **164**: 223-233.
- Bordenstein, S.R. & Wernegreen, J.J. 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): Infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 1981-1991.
- Bordenstein, S. & Rosengaus, R.B. 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. *Current Microbiology* **51**: 393-398.
- Bordenstein, S.R. & Werren, J.H. 2007. Bidirectional incompatibility among divergent *Wolbachia* and incompatibility level differences among closely related *Wolbachia* in *Nasonia*. *Heredity* **99**: 278-287.
- Bordenstein, S.R., Paraskevopoulos, C., Hotopp, J.C.D., Sapountzis, P., Lo, N., Bandi, C., Tettelin, H., Werren, J.H. & Bourtzis, K. 2009. Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say. *Molecular Biology and Evolution* **26**: 231-241.
- Bordenstein, S.R. & Bordenstein, S.R. 2011. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility. *PloS one* **6**: e29106.
- Bos, D. & Posada, D. 2005. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Developmental and Comparative Immunology* **29**: 211-227.
- Bossan, B., Koehncke, A. & Hammerstein, P. 2011. A New Model and Method for Understanding *Wolbachia* Induced Cytoplasmic Incompatibility. *Plos One* **6**: e19757.
- Bouchon, D., Rigaud, T. & Juchault, P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **265**: 1081-1090.
- Bové, J.M. 1997. *Spiroplasmas*: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wien Klin Wochenschr.* **109**: 604-612
- Boyle, L., O'Neill, S.L., Robertson, H.M. & Karr, T.L. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* **260**: 1796-1799.
- Bradley, R., Bull, J., Johnson, A. & Hillis, D. 1993. Origin of a novel allele in a mammalian hybrid zone. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **90**: 8939-8941.
- Branca, A., Vavre, F., Silvain, J.-F. & Dupas, S. 2009. Maintenance of adaptive differentiation by *Wolbachia* induced bidirectional cytoplasmic incompatibility: the importance of sib-mating and genetic systems. *Bmc Evolutionary Biology* **9**: 185.
- Braquart-Varnier, C., Lachat, M., Herbinier, J., Johnson, M., Caubet, Y., Bouchon, D. & Sicard, M. 2008. *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *Plos One* **3**: e3286.
- Breeuwer, J.A.J. & Werren, J.H. 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* **135**: 565-574.
- Brelsfoard, C.L. & Dobson, S.L. 2011. *Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **48**: 1008-1015.



- Bressac, C. & Rousset, F. 1993. The Reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans* – Dapi staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *Journal of Invertebrate Pathology* **61**: 226-230.
- Breton, M., Duret, S., Danet, J.-L., Dubrana, M.-P. & Renaudin, J. 2010. Sequences essential for transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector, *Circulifer haematoceps*, revealed by plasmid curing and replacement based on incompatibility. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 3198-3205.
- Brothers, A. N. & Delph, L.F. 2010. Haldane's rule is extended to plants with sex chromosomes. *Evolution* **64**: 3643–3648
- Brown, B. 2001. Diversity of flies, gnats and mosquitoes. In: *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol. 2 (S. Levin, ed., pp. 815-826. Academic Press.
- Brucker, R.M. & Bordenstein, S.R. 2012a. Speciation by symbiosis. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* **27**: 443-451.
- Brucker, R.M. & Bordenstein, S.R. 2012b. The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution* **66**: 349-362.
- Buño, I., Torroja, E., Lopez-Fernandez, C., Butlin, R.K., Hewitt, G.M. & Gosálvez, J. 1994. A Hybrid Zone Between 2 Subspecies of the Grasshopper *Chorthippus parallelus* Along the Pyrenees - the West End. *Heredity* **73**: 625-634.
- Burton, R.S. & Barreto, F.S. 2012. A disproportionate role for mtDNA in Dobzhansky–Muller incompatibilities? *Molecular Ecology* **21**: 4942-4957.
- Butlin, R.K. & Hewitt, G.M. 1985a. A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (orthoptera, Acrididae) - Morphological and Electrophoretic Characters. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 269-285.
- Butlin, R.K. & Hewitt, G.M. 1985b. A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (orthoptera, Acrididae) - Behavioral Characters. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 287-299.
- Butlin, R.K. & Ritchie, M.G. 1991. Variation in female mate preference across a grasshopper hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* **4**: 227-240.
- Butlin, R.K., Ritchie, M.G. & Hewitt, G.M. 1991. Comparisons among morphological characters and between localities in the *Chorthippus parallelus* hybrid zone (orthoptera, Acrididae). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **334**: 297-308.
- Callaini, G., Dallai, R. & Riparbelli, M.G. 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of Cell Science* **110**: 271-280.
- Carmona, M., Sepúlveda, D., Cárdenas, C., Nilo, L. & Marshall, S.H. 2012. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a powerful novel alternative for differentiation of epizootic ISA Virus variants. *Plos One* **7**: e37353.
- Carrington, L.B., Hoffmann, A.A. & Weeks, A.R. 2010. Monitoring long-term evolutionary changes following *Wolbachia* introduction into a novel host: the *Wolbachia* popcorn infection in *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277**: 2059-2068.
- Carstens, B.C., Degenhardt, J.D., Stevenson, A.L. & Sullivan, J. 2005. Accounting for coalescent stochasticity in testing phylogeographical hypotheses: modelling Pleistocene population structure in the Idaho giant salamander *Dicamptodon aterrimus*. *Molecular Ecology* **14**: 255-265.
- Casiraghi, M., Bordenstein, S.R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J.J., Werren, J.H. & Bandi, C. 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on gltA, groEL and ftsZ gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology-sgm* **151**: 4015-4022.



- Castillo-Davis, C.I., Hartl, D.L. & Achaz, G. 2004. cis-Regulatory and protein evolution in orthologous and duplicate genes. *Genome Research* **14**: 1530-1536.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 540-552.
- Caugant, D.A., Frøholm, L.O., Bøvre, K., Holten, E., Frasch, C.E., Mocca, L.F., Zollinger, W.D. & Selander, R.K. 1987. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie van Leeuwenhoek* **53**: 389-394.
- Chafee, M.E., Zecher, C.N., Gourley, M.L., Schmidt, V.T., Chen, J.H., Bordenstein, S.R., Clark, M.E. & Bordenstein, S.R. 2011. Decoupling of host-symbiont-phage coadaptations following transfer between insect species. *Genetics* **187**: 203-215.
- Chan, M.-S., Maiden, M.C.J. & Spratt, B.G. 2001a. Database-driven Multi Locus Sequence Typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* **17**: 1077-1083.
- Chan, P.K.S., Chan, D.P.C., To, K.-F., Yu, M.Y., Cheung, J.L.K. & Cheng, A.F. 2001b. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *Journal of Clinical Pathology* **54**: 401-403.
- Charlat, S., Hornett, E.A., Fullard, J.H., Davies, N., Roderick, G.K., Wedell, N. & Hurst, G.D.D. 2007. Extraordinary flux in sex ratio. *Science* **317**: 214-214.
- Charlesworth, B. 1992. Evolutionary rates in partially self-fertilizing species. *American Naturalist* **140**: 126-148.
- Chevalier, F., Herbinier-Gaboreau, J., Bertaux, J., Raimond, M., Morel, F., Bouchon, D., Greve, P. & Braquart-Varnier, C. 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: meeting with their invaders, *Wolbachia*. *PloS one* **6**: e18531.
- Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species*. John Murray, UK.
- Ciofi, C., Milinkovitch, M.C., Gibbs, J.P., Caccone, A. & Powell, J.R. 2002. Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galápagos tortoises. *Molecular Ecology* **11**: 2265-2283.
- Clancy, D.J. & Hoffmann, A.A. 1998. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **86**: 13-24.
- Clark, M.E. & Karr, T.L. 2002. Distribution of *Wolbachia* within *Drosophila* reproductive tissue: Implications for the expression of cytoplasmic incompatibility. *Integrative and Comparative Biology* **42**: Soc Integrat & Comparat Biol.
- Clark, M.E., Veneti, Z., Bourtzis, K. & Karr, T.L. 2002. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **111**: 3-15.
- Clark, M.E., Veneti, Z., Bourtzis, K. & Karr, T.L. 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mechanisms of Development* **120**: 185-198.
- Clark, M.E., Bailey-Jourdain, C., Ferree, P.M., England, S.J., Sullivan, W., Windsor, D.M. & Werren, J.H. 2008. *Wolbachia* modification of sperm does not always require residence within developing sperm. *Heredity* **101**: 420-428.
- Clark, T.B., Whitcomb, R.F., Tully, J.G., Mouches, C., Saillard, C., Bové, J.M., Wroblewski, H., Carle, P., Rose, D.L., Henehar, R.B. & Williamson, D.L. 1985. *Spiroplasma melliferum*, a new species from the Honeybee (*Apis mellifera*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**: 296-308.
- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of Bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* **17**: 840-862.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. & Tiedje, J.M. 2009. The Ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **37**: D141-D145.





- Conord, C., Despres, L., Vallier, A., Balmand, S., Miquel, C., Zundel, S., Lemperiere, G. & Heddi, A. 2008. Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in curculionoidea: additional evidence of symbiont replacement in the dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 859-868.
- Cook, J.M. & Butcher, R.D.J. 1999. The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Researches On Population Ecology* **41**: 15-28.
- Cooper, S.J. & Hewitt, G.M. 1993. Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Insect molecular biology* **2**: 185-194.
- Cooper, S.J., Ibrahim, K.M. & Hewitt, G.M. 1995. Postglacial expansion and genome subdivision In the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **4**: 49-60.
- Cordaux, R., Michel-Salzat, A. & Bouchon, D. 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 237-243.
- Cordaux, R., Pichon, S., Ling, A., Perez, P., Delaunay, C., Vavre, F., Bouchon, D. & Greve, P. 2008. Intense transpositional activity of insertion sequences in an ancient obligate endosymbiont. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1889-1896.
- Cordes, N., Yiğit, A., Engqvist, L. & Schmoll, T. 2013. Differential sperm expenditure reveals a possible role for post-copulatory sexual selection in a lekking moth. *Ecology and Evolution* **3**: 503-511.
- Coulon, A., Fitzpatrick, J.W., Bowman, R., Stith, B.M., Makarewich, C.A., Stenzler, L.M. & Lovette, I.J. 2008. Congruent population structure inferred from dispersal behaviour and intensive genetic surveys of the threatened Florida scrub-jay (*Aphelocoma coerulescens*). *Molecular Ecology* **17**: 1685-1701.
- Coyne, J.A. 1985. The genetic basis of Haldane's rule. *Nature* **314**: 736-738.
- Coyne, J.A. 1992. Genetics and speciation. *Nature* **355**: 511-515.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M.E. & Bouletreau, M. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6247-6252.
- Didelot, X. & Falush, D. 2007. Inference of Bacterial Microevolution Using Multilocus Sequence Data. *Genetics* **175**: 1251-1266.
- Didelot, X. & Maiden, M.C.J. 2010. Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology* **18**: 315-322.
- Didelot, X., Bowden, R., Street, T., Golubchik, T., Spencer, C., McVean, G., Sangal, V., Anjum, M.F., Achtman, M., Falush, D. & Donnelly, P. 2011. Recombination and population structure in *Salmonella enterica*. *PLoS Genet* **7**: e1002191.
- Dillon, R.J., Webster, G., Weightman, A.J., Dillon, V.M., Blanford, S. & Charnley, A.K. 2008. Composition of Acridid gut bacterial communities as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**: 265-272.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R. & Maiden, M.C.J. 2001. Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 14-23.
- Dobson, S.L. 2004. Evolution of *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility types. *Evolution* **58**: 2156-2166.
- Dobson, S.L. 2007. Transfection of *Wolbachia pipientis* into *Drosophila* embryos. *Current protocols in microbiology* **Chapter 3**.
- Dobzhansky, T. 1934. Studies on hybrid sterility. I. Spermatogenesis in pure and hybrid *Drosophila pseudoobscura*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **21**: 169-221.



- Dobzhansky, T. 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York, USA.
- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F. & Douzery, E.J.P. 2003. Comparison of bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 248-254.
- Doudoumis, V., Tsiamis, G., Wamwiri, F., Brelsfoard, C., Alam, U., Aksoy, E., Dalaperas, S., Abd-Alla, A., Ouma, J., Takac, P., Aksoy, S. & Bourtzis, K. 2012. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). *BMC Microbiology* **12**: S3.
- Doyle, J.J., Flagel, L.E., Paterson, A.H., Rapp, R.A., Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Wendel, J.F. 2008. Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. In: *Annual Review of Genetics*, Vol. 42, pp. 443-461. Annual Reviews, Palo Alto.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1185-1192.
- Dubnau, D., Smith, I., Morell, P. & Marmur, J. 1965. Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc Natl Acad Sci USA* **54**: 491-498.
- Dunn, A.M. & Rigaud, T. 1998. Horizontal transfer of parasitic sex ratio distorters between crustacean hosts. *Parasitology* **117**: 15-19.
- Dunn, C.W., Hejnal, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sorensen, M.V., Haddock, S.H.D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q. & Giribet, G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* **452**: 745-749.
- Duron, O., Labbe, P., Berticat, C., Rousset, F., Guillot, S., Raymond, M. & Weill, M. 2006. High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution* **60**: 303-314.
- Duron, O. & Weill, M. 2006. *Wolbachia* infection influences the development of *Culex pipiens* embryo in incompatible crosses. *Heredity* **96**: 493-500.
- Duron, O., Fort, P. & Weill, M. 2007. Influence of aging on cytoplasmic incompatibility, sperm modification and *Wolbachia* density in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity* **98**: 368-374.
- Duron, O. & Gavotte, L. 2007. Absence of *Wolbachia* in nonfilarid worms parasitizing arthropods. *Current Microbiology* **55**: 193-197.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstadter, J. & Hurst, G. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *Bmc Biology* **6**: 27.
- Duron, O., Wilkes, T.E. & Hurst, G.D.D. 2010. Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecology Letters* **13**: 1139-1148.
- Earl, D.A. & vonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 4: 359-361.
- Ebbert, M.A. 1991. The Interaction Phenotype in the *Drosophila willistoni*-*Spiroplasma* Symbiosis. *Evolution* **45**: 971-988.
- Eberhard, W.G. 1994. Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications for cryptic female choice. *Evolution* **48**: 711-733.
- Egas, M., Vala, F. & Breeuwer, J.A.J. 2002. On the evolution of cytoplasmic incompatibility in haplodiploid species. *Evolution* **56**: 1101-1109.
- Endler, A. 1982. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *American Zoologist* **22**: 441-452.

- Engelstädter, J., Telschow, A. & Hammerstein, P. 2004. Infection dynamics of different *Wolbachia*-types within one host population. *J Theor Biol* **231**: 345–355.
- Engelstaedter, J., Hammerstein, P. & Hurst, G.D.D. 2007. The evolution of endosymbiont density in doubly infected host species. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 685-695.
- Engelstädter, J. & Hurst, G.D.D. 2009. The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**: 127-149.
- Engelstaedter, J. & Telschow, A. 2009. Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity* **103**: 196-207.
- Enigl, M. & Schausberger, P. 2007. Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phytoseiid mites and associated prey. *Experimental and Applied Acarology* **42**: 75-85.
- Enright, M. & Spratt, B. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* **7**: 482–487.
- Espino, C.I., Gómez, T., González, G., do Santos, M.F.B., Solano, J., Sousa, O., Moreno, N., Windsor, D., Ying, A., Vilchez, S. & Osuna, A. 2009. Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 547-550.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Ewens, W.J. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Pop. Biol.* **3**: 87-112.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. 2003a. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., Yamaoka, Y., Mégraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M. & Suerbaum, S. 2003b. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**: 1582-1585.
- Fearnhead, P., Smith, N.C., Barrigas, M., Fox, A. & French, N. 2005. Analysis of recombination in *Campylobacter jejuni* from MLST population data. *Journal of Molecular Evolution* **61**: 333-340.
- Feener, J. & Donald, H. 1997. Diptera as parasitoids. *Annu. Rev. Entomol* **42**: 73–97.
- Feil, E.J., Maiden, M.C., Achtman, M. & Spratt, B.G. 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1496-1502.
- Feil, E.J., Smith, J.M., Enright, M.C. & Spratt, B.G. 2000. Estimating Recombinational Parameters in *Streptococcus pneumoniae* From Multilocus Sequence Typing Data. *Genetics* **154**: 1439-1450.
- Feil, E.J., Holmes, E.C., Bessen, D.E., Chan, M.-S., Day, N.P.J., Enright, M.C., Goldstein, R., Hood, D.W., Kalia, A., Moore, C.E., Zhou, J. & Spratt, B.G. 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: Short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 182-187.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. . *Evolution* **39**: 783-791.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.

- Feng, D.-F. & Doolittle, R. 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution* **25**: 351-360.
- Ferrari, J. & Vavre, F. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-biological Sciences* **366**: 1389-1400.
- Ferree, P.M., Frydman, H.M., Li, J.M., Cao, J., Wieschaus, E. & Sullivan, W. 2005. *Wolbachia* utilizes host microtubules and dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. *Plos Pathogens* **1**: e14.
- Ferris, C., Rubio, J.M., Serrano, L., Gosálvez, J. & Hewitt, G.M. 1993. One-way introgression of a subspecific sex-chromosome marker in a hybrid zone. *Heredity* **71**: 119-129.
- Fisher, R.A. 1922. On the Interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* **85**: 87-94.
- Flanagan, N.S., Mason, P.L., Gosálvez, J. & Hewitt, G.M. 1999. Chromosomal differentiation through an Alpine hybrid zone in the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 577-585.
- Fleury, F., Vavre, F., Ris, N., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology* **121**: 493-500.
- Flor, M., Hammerstein, P. & Telschow, A. 2007. *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and the stability of infection polymorphism in parapatric host populations. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 696-706.
- Fontdevila, A. 2012. Especiación. In: *El árbol de la vida: Sistemática y evolución de los seres vivos* (P. Vargas & R. Zardoya, eds). Museo de Ciencias Naturales, Madrid.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E. & Slatko, B. 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *Plos Biology* **3**: e121.
- Foster, J., Slatko, B., Bandi, C. & Kumar, S. 2011. Recombination in *Wolbachia* endosymbionts of filarial nematodes? *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1921-1922.
- Frank, S.A. 1991. Divergence of meiotic drive-suppression systems as an explanation for sex-biased hybrid sterility and inviability. *Evolution* **45**: 262-267.
- Frank, S.A. 1998. Dynamics of cytoplasmic incompatibility with multiple *Wolbachia* infections. *Journal of Theoretical Biology* **192**: 213-218.
- Fraune, S. & Bosch, T.C.G. 2010. Why bacteria matter in animal development and evolution. *BioEssays* **32**: 571-580.
- Frederick, B.A. & Caesar, J. 2000. *Analysis of Bacterial Communities Associated with Insect Biological Control Agents using Molecular Techniques*. Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds, Montana State University, Bozeman, Montana, USA.
- Frid, L. & Myers, J.H. 2002. Thermal ecology of western tent caterpillars *Malacosoma californicum pluviale* and infection by nucleopolyhedrovirus. *Ecological Entomology* **27**: 665-673.
- Frost, C.L., Fernandez-Marin, H., Smith, J.E. & Hughes, W.O.H. 2010. Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants. *Molecular Ecology* **19**: 4077-4085.
- Frydman, H.M., Li, J.M., Robson, D.N. & Wieschaus, E. 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* **441**: 509-512.
- Fu, Y. & Li, W. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**: 693-709.

- Fu, Y. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.
- Fukatsu, T. & Ishikawa, H. 1993. Occurrence of Chaperonin 60 and Chaperonin 10 in primary and secondary bacterial symbionts of aphids: Implications for the evolution of an endosymbiotic system in aphids. *Journal of Molecular Evolution* **36**: 568-577.
- Fukatsu, T., Watanabe, K. & Y, S. 1998. Specific detection of intracellular symbiotic bacteria of aphids by oligonucleotide-probed in situ hybridization. *Appl. Entomol. Zool* **33**: 461-472.
- Funaro, C.F., Kronauer, D.J.C., Moreau, C.S., Goldman-Huertas, B., Pierce, N.E. & Russell, J.A. 2011. Army ants harbor a host-specific clade of Entomoplasmatales Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 346-350.
- Fytrou, A., Schofield, P.G., Kraaijeveld, A.R. & Hubbard, S.F. 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences* **273**: 791-796.
- Gao, B. & Gupta, R. 2005. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International Journal on Systematic Evolution in Microbiology* **55**.
- Garcia-Moyano, A., Gonzalez-Toril, E., Aguilera, A. & Amils, R. 2007. Prokaryotic community composition and ecology of floating macroscopic filaments from an extreme acidic environment, Rio Tinto (SW, Spain). *Systematic and Applied Microbiology* **30**: 601-614.
- García Pérez, A. 2005. Modelos Log-linelaes. In: *Métodos avanzados de estadística aplicada: Técnicas avanzadas.*, pp. 183-214. UNED, Madrid.
- Gardiner, K. 1999. [10] Saturation identification of coding sequences in genomic DNA. In: *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 303 (M. W. Sherman, ed., pp. 144-161. Academic Press.
- Gasparich, G.E., Whitcomb, R.F., Dodge, D., French, F.E., Glass, J. & Williamson, D.L. 2004. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 893-918.
- Gavotte, L., Vavre, F., Henri, H., Ravallec, M., Stouthamer, R. & Bouletreau, M. 2004. Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species. *Insect Molecular Biology* **13**: 147-153.
- Gavrilets, S. 1997. Hybrid zones with epistatic selection of Dobzhansky type. *Evolution* **51**: 1027-1035.
- Gavrilets, S. 2003. Perspective: models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* **57**: 2197-2215.
- Geiger, A., Fardeau, M.-L., Grebaut, P., Vatunga, G., Josenando, T., Herder, S., Cuny, G., Truc, P. & Ollivier, B. 2009. First isolation of Enterobacter, Enterococcus, and Acinetobacter spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infection Genetics and Evolution* **9**: 1364-1370.
- Gelman, A. & Rubin, D.B. 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science* **7**: 457-472.
- Gentry, G. & Dyer, L. 2002. On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology* **83**: 3108-3119.
- Gibbs, M., Armstrong, J. & Gibbs, A. 2000. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**: 573-582. .
- Giordano, R., O'Neill, S.L. & Robertson, H.M. 1995a. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* **140**: 1307-1317.
- Glez-Pena, D., Gomez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F. & Posada, D. 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research* **38**: W14-W18.

- Godfray, H. 1994. *Parasitoids. Behavioural nad Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton
- Gomez-Valero, L., Soriano-Navarro, M., Perez-Brocal, V., Heddi, A., Moya, A., Garcia-Verdugo, J.M. & Latorre, A. 2004. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *Journal of Bacteriology* **186**: 6626-6633.
- Gomez, A. & Lunt, D.H. 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography of Southern European Refugia: Evolutionary perspective on the origins and conservation of european biodiversity*: 155-188.
- Gompert, Z., Forister, M.L., Fordyce, J.A. & Nice, C.C. 2008. Widespread mito-nuclear discordance with evidence for introgressive hybridization and selective sweeps in Lycaeides. *Molecular Ecology* **17**: 5231-5244.
- Gonella, E., Crotti, E., Rizzi, A., Mandrioli, M., Favia, G., Daffonchio, D. & Alma, A. 2012. Horizontal transmission of the symbiotic bacterium *Asaia* sp. in the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). *BMC Microbiology* **12**: S4.
- Goodacre, S.L., Martin, O.Y., Thomas, C.F.G. & Hewitt, G.M. 2006. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. *Molecular Ecology* **15**: 517-527.
- Goodacre, S.L. 2011. Endosymbiont Infections in Spiders. *Advances In Insect Physiology, Vol 40: Spider Physiology and Behaviour - Physiology* **40**: 137-153.
- Gosalvez, J., Lopezfernandez, C., Bella, L.J., Butlin, R.K. & Hewitt, G.M. 1988. A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera, Acrididae) - Chromosomal differentiation. *Genome* **30**: 656-663.
- Goto, S., Anbutsu, H. & Fukatsu, T. 2006. Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4805-4810.
- Grenier, S., Pintureau, B., Heddi, A., Lassabliere, F., Jager, C., Louis, C. & Khatchadourian, C. 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **265**: 1441-1445.
- Grundmann, G., Neyra, M. & Normand, P. 2000. High-resolution phylogenetic analysis of NON2-oxidizing Nitrobacter species using the rrs-rrl IGS sequence and rrl genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1853-1898.
- Guruprasad, N., Mouton, L., Sumithra, S. & Puttaraju, H. 2011a. Survey of *Wolbachia*; and Its Phage WO in the Uzifly *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). *Current Microbiology* **63**: 267-272.
- Guruprasad, N.M., Mouton, L. & Puttaraju, H.P. 2011b. Effect of *Wolbachia* infection and temperature variations on the fecundity of the Uzifly *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). *Symbiosis* **54**: 151-158.
- Hadfield, S.J. & Axton, J.M. 1999. Reproduction - Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria. *Nature* **402**: 482-482.
- Haine, E.R., Pickup, N.J. & Cook, J.M. 2005. Horizontal transmission of *Wolbachia* in a *Drosophila* community. *Ecological Entomology* **30**: 464-472.
- Haldane, J.B.S. 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* **12**: 101-109.
- Haldane, J.B.S. 1932. *The causes of evolution*. Longmans Green and Co, New York, USA.
- Hall, B. 2000. *Phylogenetic trees made easy: a How-to manual for molecular biologists*. Sinauer Associates, USA.
- Hampton, J., Spencer, P., Alpers, D., Twigg, L., Woolnough, A., Doust, J., Higgs, T. & Pluske, J. 2004. Molecular techniques, wildlife management and the importance of genetic population structure and dispersal: a case study with feral pigs. *Journal of Applied Ecology* **41**.

- Hanelt, B. & Janovy Jr, J. 2003. Spanning the gap: experimental determination of paratenic host specificity of horsehair worms (Nematomorpha: Gordiida). *Invertebrate Biology* **122**: 12-18.
- Hanelt, B. & Janovy Jr, J. 2004. Life cycle and paratenesis of american Gordiids (Nematomorpha: Gordiida). *Papers in the Biological Science*.
- Hanelt, B., Thomas, F. & Schmidt-Rhaesa, A. 2005. Biology of the phylum Nematomorpha. *Adv Parasitol* **59**.
- Hanelt, B., Bolek, M.G. & Schmidt-Rhaesa, A. 2012. Going Solo: Discovery of the first parthenogenetic Gordiid (Nematomorpha: Gordiida). *Plos One* **7**: e34472.
- Harrison, R.G. 1990. Hybrid zones and the evolutionary process. In: *Oxford surveys in Evolutionary Biology*, Vol. 7 (D. Futuyma & J. Antonovics, eds). Oxford University press.
- Haselkorn, T.S., Markow, T.A. & Moran, N.A. 2009. Multiple introductions of the *Spiroplasma* bacterial endosymbiont into *Drosophila*. *Molecular Ecology* **18**: 1294-1305.
- Haselkorn, T.S. 2010. The *Spiroplasma* heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila*. *Fly* **4**: 80-87.
- Haygood, R. & Turelli, M. 2009. Evolution of Incompatibility inducing microbes In subdivided host populations. *Evolution* **63**: 432-447.
- Heath, B.D., Butcher, R.D.J., Whitfield, W.G.F. & Hubbard, S.F. 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* **9**: 313-316.
- Heddi, A., Grenier, A.M., Khatchadourian, C., Charles, H. & Nardon, P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6814-6819.
- Heikkinen, E. & Lumme, J. 1998. The Y chromosomes of *Drosophila lummei* and *D. novamexicana* differ in fertility factors. *Heredity* **81**: 505-513.
- Heliconius-consortium 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature advance online publication*.
- Hertig, M. & Wolbach, B. 1924. Studies on Rickettsia-like micro-organisms in insects. *J Med Res* **44** 329-374.
- Hewitt, G. 1988. Hybrid zones — natural laboratories for evolution studies. *Trends in Ecology & Evolution* **3**: 158-166
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hewitt, G.M. & Barton, N. 1981. The structure and maintenance of hybrid zones as exemplified by *Podisma pedestris*. In: *Insects Cytogenetics Symposia of the Royal Entomological Society of London*, Vol. 10 (R. L. Blackman, G. M. Hewitt & M. Ashburner, eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Hewitt, G.M., Butlin, R.K. & East, T.M. 1987. Testicular dysfunction In hybrids between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Biological Journal of the Linnean Society* **31**: 25-34.
- Hewitt, G.M. 1988. Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution* **3**.
- Hewitt, G.M. 1993. After the ice - *parallelus* meets *erythropus* in the Pyrenees. In: *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (R. G. Harrison, ed., pp. 140-164. Oxford University Press, Oxford.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hewitt, G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hewitt, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: Genet Soc; Univ E Anglia.



- Hewitt, G.M. 2011. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* **139**: 617-638.
- Higgins, D.G. & Sharp, P.M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. & Werren, J. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 215-220.
- Hilgenboecker, K., Telschow, A. & Hammerstein, P. 2009. *Wolbachia*'s role in classical speciation theory. *Tesis doctoral* Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I Humboldt-Universität zu Berlin.
- Hillis, D.M. & Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**: 182-192.
- Hirano, S.S. & Upper, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 624–653.
- Hoffmann, A.A., Turelli, M. & Harsman, L.G. 1990. Factors affecting the distribution of Cytoplasmic Incompatibility In *Drosophila simulans*. *Genetics* **126**: 933-948.
- Hoffmann, A.A., Hercus, M. & Dagher, H. 1998. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **148**: 221-231.
- Hoffmann, S. & Brown, W. 1995. The molecular mechanism underlying the 'rare allele phenomenon' in a subspecific hybrid zone of the California Field Mouse, *Peromyscus californicus*. *Journal of Molecular Evolution* **41**: 1165-1169.
- Holder, M. & Lewis, P.O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat Rev Genet* **4**: 275-284.
- Holsinger, K.E. 2012. Tajima's D, Fu's FS, Fay and Wu's H, and Zeng et al.'s notes: <http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecturenotes/molevol-tajima.pdf>
- Holt, K., Thomson, N., Wain, J., Langridge, G., Hasan, R., Bhutta, Z., Quail, M., Norbertczak, H., Walker, D., Simmonds, M., White, B., Bason, N., Mungall, K., Dougan, G. & Parkhill, J. 2009. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* **10**: 36.
- Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J.D.A. & Willems, R.J.L. 2002. Multilocus Sequence Typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 1963-1971.
- Hordijk, W. & Gascuel, O. 2005. Improving the efficiency of SPR moves in phylogenetic tree search methods based on maximum likelihood. *Bioinformatics* **21**: 4338-4347.
- Houck, M., Clark, J., Peterson, K. & Kidwell, M. 1991. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* **253**: 1125–1129.
- Hudson, A.J. & Floate, K.D. 2009. Further evidence for the absence of Bacteria in horsehair worms (Nematomorpha: Gordiidae). *Journal of Parasitology* **95**: 1545-1547.
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. 2004. Frequentist properties of bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology* **53**: 904-913.
- Hughenoltz, P., Tyson, G.W. & L.L., B. 2002. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol* **179**: 29-42.
- Hughes, D.P., Pamilo, P. & Kathirithamby, J. 2004. Horizontal transmission of *Wolbachia* by strepsipteran endoparasites? A response to Noda *et al.*, 2001. *Molecular Ecology* **13**: 507-509.
- Huigens, M.E., de Almeida, R.P., Boons, P.A.H., Luck, R.F. & Stouthamer, R. 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **271**: 509-515.





- Hull, D.L. 1997. Species: the units of biodiversity In: *The ideal species concept—and why we can't get it* (C. a. Hall, ed., London, UK).
- Huntley, B. & Birks, H.J.B. 1983. *An atlas of past and present pollen maps for Europe 0-13,000 Years ago*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hurst, G.D.D., von der Schulenburg, J.H.G., Majerus, T.M.O., Bertrand, D., Zakharov, I.A., Baungaard, J., Völkl, W., Stouthamer, R. & Majerus, M.E.N. 1999. Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. *Insect Molecular Biology* **8**: 133-139.
- Hurst, G.D.D., Johnson, A.P., von der Schulenburg, J.H.G. & Fuyama, Y. 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: A temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* **156**: 699-709.
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M. & Robinson, S.J.W. 2001. What causes inefficient transmission of male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*? *Heredity* **87**: 220-226.
- Hurst, L.D. & Pomiankowski, A. 1991. Causes of sex ratio bias may account for unisexual sterility in hybrids: A new explanation of Haldane's rule and related phenomena. *Genetics* **128**: 841-858.
- Hurst, L.D. 2002. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends in Genetics* **18**: 486-487.
- Huynh, J.R. 2000. Fusome as a cell-cell communication channel of *Drosophila* ovarian cyst. *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bioscience. Austin, TX, USA.
- Ibrahim, K.M., Cooper, S.J.B. & Hewitt, G.M. 2002. Testing for recombination in a short nuclear DNA sequence of the European meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **11**: 583-590.
- Ikeda, T., Ishikawa, H. & Sasaki, T. 2003a. Infection density of *Wolbachia* and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **84**: 1-5.
- Ikeda, T., Ishikawa, H. & Sasaki, T. 2003b. Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, and the almond moth, *Cadra cautella*. *Zoological Science* **20**: 153-157.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., L.M.Kawchuk & Goettel, M.S. 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biological control : theory and applications in pest management*. **14**.
- Inoue, I. 1959. Distribution of acid and alkaline phosphatases in the hairworm, *Chordodes japonensis*. *Annot Zool Japon* **32**: 209-213.
- Irwin, M., Schlinger, E. & Thompson, F. 2003. Diptera, true flies. In: *The Natural History of Madagascar* (S. Goodman & J. Benstead, eds), pp. 692-702. University of Chicago Press.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T. & O' Neill, S.L. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep* **12**: 508-518.
- Izawa, T. 2007. Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in *Arabidopsis* and rice. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3091-3097.
- Jaenike, J., Dyer, K.A., Cornish, C. & Minhas, M.S. 2006. Asymmetrical reinforcement and *Wolbachia* infection in *Drosophila*. *Plos Biology* **4**: e325.
- Jaenike, J., Stahlhut, J.K., Boelio, L.M. & Unckless, R.L. 2010. Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila* neotestacea: an emerging symbiotic mutualism. *Molecular Ecology* **19**: 414-425.
- Jansen, G.J., Mooibroek, M., Idema, J., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W. & Degener, J.E. 2000. Rapid identification of Bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* **38**: 814-817.



- Janzen, D. & Hallwachs, W. 2006. Dynamic database for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of the Area de Conservacion Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica.
- Jason, A.W., Sarah, B.K., Zahra, M., Maya Metni, P. & Michael, F.H. 2004. Global patterns of human mitochondrial DNA and Y-chromosome structure are not influenced by higher migration rates of females versus males. *Nature Genetics* **36**: 1122-1125.
- Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* **9**: 393-405.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. & Allsopp, M.H. 2009. Multiple *Wolbachia* strains in *Apis mellifera capensis* from South Africa. *Apidologie* **40**: 178-183.
- Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. 2010. Real-time Pcr reveals endosymbiont titer fluctuations in *Metaseiulus Occidentalis* (acari: Phytoseiidae) colonies held at different temperatures. *Florida Entomologist* **93**: 464-466.
- Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., Jiggins, C.D., v. d. Schulenburg, J.H.G. & Majerus, M.E.N. 2000. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology* **120**: 439-446.
- Jiggins, F.M., von der Schulenburg, J.H.G., Hurst, G.D.D. & Majerus, M.E.N. 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences* **268**: 1423-1427.
- Jiggins, F.M. 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1640-1643.
- Jiggins, F.M., Bentley, J.K., Majerus, M.E.N. & Hurst, G.D.D. 2002a. Recent changes in phenotype and patterns of host specialization in *Wolbachia* bacteria. *Molecular Ecology* **11**: 1275-1283.
- Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D. & Yang, Z. 2002b. Host-Symbiont conflicts: Positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic Rickettsiaceae. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1341-1349.
- Jiggins, F.M. 2003. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: Selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics* **164**: 5-12.
- Jochemsen, P., Schilthuizen, M. & Stouthamer, R. 1998. Transmission of *Wolbachia* between Trichogramma species and their lepidopteran hosts? *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (nev)*: Netherlands Entomolog Soc (NEV); Koppert Biolog Syst; Boekhandel KooykerEOLEOLGinsberg.
- Johannesson, K., Panova, M., Kemppainen, P., André, C., Rolán-Alvarez, E. & Butlin, R.K. 2010. Repeated evolution of reproductive isolation in a marine snail: unveiling mechanisms of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**: 1735-1747.
- Johanowicz, D.L. & Hoy, M.A. 1996. *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). *Annals of the Entomological Society of America* **89**: 435-441.
- Johnson, C.N., Benjamin, J., William H., Moser, S.A., Hollingshead, S.K., Zheng, X., Crain, M.J., Nahm, M.H. & Waites, K.B. 2003. Genetic Relatedness of Levofloxacin-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Isolates from North America. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 2458-2464.
- Johnson, J. & Omland, K. 2004. Model selection in ecology and evolution. *TRENDS in Ecology and Evolution* **19**.
- Jolley, K., Chan, M.-S. & Maiden, M. 2004. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**: 86.



- Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.-S. & Maiden, M.C.J. 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* **17**: 1230-1231.
- Jolley, K.A., Wilson, D.J., Kriz, P., Mcvean, G. & Maiden, M.C.J. 2005. The Influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 562-569.
- Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.-S., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D.W.M., Harding, R.M., Bisharat, N. & Spratt, B.G. 2003. Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 2530-2536.
- Kageyama, D., Anbutsu, H., Watada, M., Hosokawa, T., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2006. Prevalence of a non-male-killing *Spiroplasma* in natural populations of *Drosophila hydei*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6667-6673.
- Kageyama, D., Anbutsu, H., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2007. *Spiroplasma* infection causes either early or late male killing in *Drosophila*, depending on maternal host age. *Naturwissenschaften* **94**: 333-337.
- Kambris, Z., Blagborough, A.M., Pinto, S.B., Blagrove, M.S.C., Godfray, H.C.J., Sinden, R.E. & Sinkins, S.P. 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *Plos Pathogens* **6**: e1001143.
- Kathirithamby, J. 2000. Morphology of the female Myrmecolacidae (Strepsiptera) including the apron, and an associated structure analogous to the peritrophic matrix. *Zoological Journal of the Linnean Society* **128**: 269-287.
- Keller, G.P., Windsor, D.M., Saucedo, J.M. & Werren, J.H. 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Molecular Ecology* **13**: 2405-2420.
- Keller, I. & Seehausen, O. 2012. Thermal adaptation and ecological speciation. *Molecular Ecology* **21**: 782-799.
- Keswaniã, J. & Whitman, W.B. 2001. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 667-678.
- Key, K.H.L. 1981. Species, Parapatry, and the Morabine Grasshoppers. *Systematic Zoology* **30**: 425-458.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G. & Achtman, M. 2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution* **2**: 39-45.
- Kikuchi, Y. & Fukatsu, T. 2003. Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6082-6090.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* **16**: 111-120.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of Molecular Evolution. Massachusetts, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kingman, J.F.C. 1982. On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability. Essays in Statistical Science.*: 27-43.
- Kirjanova, E. 1959. Permeability of the cuticle in freshwater hairworms (Nematomorpha: Gordioidea). *Zool Zh* 509-519.
- Kishino, H. & Hasegawa, M. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.*: 29.
- Kittayapong, P., Mongkalagoon, P., Baimai, V. & O'Neill, S.L. 2002. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* **88**: 270-274.

- Kittelmann, S., Seedorf, H., Walters, W.A., Clemente, J.C., Knight, R., Gordon, J.I. & Janssen, P.H. 2013. Simultaneous amplicon sequencing to explore Co-occurrence patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *Plos One* **8**: e47879.
- Klasson, L., Westberg, J., Sapountzis, P., Naesiund, K., Lutnaes, Y., Darby, A.C., Veneti, Z., Chen, L., Braig, H.R., Garrett, R., Bourtzis, K. & Andersson, S.G.E. 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 5725-5730.
- Koehncke, A., Telschow, A., Werren, J.H. & Hammerstein, P. 2009. Life and Death of an Influential Passenger: *Wolbachia* and the evolution of CI-modifiers by their hosts. *Plos One* **4**: e4425.
- Koevoets, T. & Beukeboom, L.W. 2008. Genetics of postzygotic isolation and Haldane's rule in haplodiploids. *Heredity* **102**: 16-23.
- Koga, R., Tsuchida, T. & Fukatsu, T. 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **270**: 2543-2550.
- Kondo, N., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2005. Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biology Letters* **1**: 488-491.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 2567-2572.
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A. & Tiedje, J.M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **361**: 1929–1940.
- Koonin, E.V. & Galperin, M.Y. 2003. *Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics*. National Center for Biotechnology Informatio. National Library of Medicine, National Institutes of Health. Kluwer Academic, USA.
- Kraaijeveld, K., Franco, P., De Knijff, P., Stouthamer, R. & Van Alphen, J.J.M. 2011. Clonal genetic variation in a *Wolbachia*-infected asexual wasp: horizontal transmission or historical sex? *Molecular Ecology* **20**: 3644-3652.
- Kremer, N. & Huigens, M.E. 2011. Vertical and horizontal transmission drive bacterial invasion. *Molecular Ecology* **20**: 3496-3498.
- Kubota, M., Morii, T. & Miura, K. 2005. In vitro cultivation of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in an *Aedes albopictus* cell line. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **117**: 83-87.
- Kunte, K., Shea, C., Aardema, M.L., Scriber, J.M., Juenger, T.E., Gilbert, L.E. & Kronforst, M.R. 2011. Sex chromosome mosaicism and hybrid speciation among tiger swallowtail butterflies. *PLoS Genet* **7**: e1002274.
- Lammers, Y., Kremer, D., Brakefield, P.M., Groenenberg, D.S.J., Pirovano, W. & Schilthuizen, M. 2013. SNP genotyping for detecting the 'rare allele phenomenon' in hybrid zones. *Molecular Ecology Resources* **13**: 237-242.
- Landmann, F., Orsi, G.A., Loppin, B. & Sullivan, W. 2009. *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS Pathog* **5**: e1000343.
- Landry, C.R., Hartl, D.L. & Ranz, J.M. 2007. Genome clashes in hybrids: insights from gene expression. *Heredity* **99**: 483-493.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (E. Stackebrandt & M. Goodfellow, eds), pp. 205–248. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England,.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lasalle, J. & Gauld, I. 1991. Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. *Redia* **74**: 315-334.
- Lassy, C.W. & Karr, T.L. 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development* **57**: 47-58.
- Lawrence, J.G. & Hendrickson, H. 2003. Lateral gene transfer: when will adolescence end? *Molecular Microbiology* **50**: 739-749.
- Lawrence, J.G. & Hendrickson, H. 2005. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. *Curr. Op. Microbiol* **8**: 572-578.
- Lee, Y.K. & Mazmanian, S.K. 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* **330**: 1768-1773.
- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Lexer, C., Buerkle, C.A., Joseph, J.A., Heinze, B. & Fay, M.F. 2006. Admixture in European *Populus* hybrid zones makes feasible the mapping of loci that contribute to reproductive isolation and trait differences. *Heredity* **98**: 74-84.
- Liao, P.C., Shih, H.C., Yen, T.B., Lu, S.Y., Cheng, Y.P. & Chiang, Y.C. 2010. Molecular evaluation of interspecific hybrids between *Acer albopurpurascens* A. *buergerianum* var. *formosanum*. *Bot. Stud.* **51**: 413-420.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Lindh, J.M. & Lehane, M.J. 2011. The tsetse fly *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossina) harbours a surprising diversity of bacteria other than symbionts. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **99**: 711-720.
- Linn, C.E., Dambroski, H.R., Feder, J.L., Berlocher, S.H., Nojima, S. & Roelofs, W.L. 2004. Postzygotic isolating factor in sympatric speciation in *Rhagoletis* flies: Reduced response of hybrids to parental host-fruit odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17753-17758.
- Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C. & Bandi, C. 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Molecular Biology and Evolution* **19**: 341-346.
- Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S.L., Werren, J.H., Bordenstein, S.R. & Bandi, C. 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 654-657.
- Looney, C., Hanelt, B. & Zack, S. 2012. New records of nematomorph parasites (Nematomorpha: Gordiida) of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) and camel crickets (Orthoptera: Raphidophoridae) in Washington State. *J Parasitol* **In Press**.
- Ludwig, W. & Schleifer, K. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev.* **15**: 155-173.
- Lunt, D., Ibrahim, K. & Hewitt, G. 1998. mtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity* **80**: 633-641.
- Luo, A., Qiao, H., Zhang, Y., Shi, W., Ho, S., Xu, W., Zhang, A. & Zhu, C. 2010. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 242.
- Luo, D., Xu, H., Liu, Z., Guo, J., Li, H., Chen, L., Fang, C., Zhang, Q., Bai, M., Yao, N., Wu, H., Wu, H., Ji, C., Zheng, H., Chen, Y., Ye, S., Li, X., Zhao, X., Li, R. & Liu, Y.-G. 2013. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet*, advance online publication.

- Maan, M.E. & Seehausen, O. 2011. Ecology, sexual selection and speciation. *Ecology Letters* **14**: 591-602.
- Madrigal, A. 1999. Notas sobre control biológico de plagas. *Universidad Nacional de Colombia, sede Medellin* : 272.
- Maheshwari, S. & Barbash, D.A. 2011. The Genetics of hybrid incompatibilities. *Annual Review of Genetics* **45**: 331-355.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J.J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. & Spratt, B.G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3140-3145.
- Majerus, T.M.O., Von Der Schulenburg, J.H.G., Majerus, M.E.N. & Hurst, G.D.D. 1999. Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Insect Molecular Biology* **8**: 551-555.
- Mallet, J. 1986. Hybrid zones of *Heliconius* butterflies in Panama and the stability and movement of warning colour dines. *Heredity* **56**: 191-202.
- Mallet, J. 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 294-299.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 229-237.
- Mallet, J. 2007. Hybrid speciation. *Nature* **446**: 279-283.
- Marcade, I., Souty-Grosset, C., Bouchon, D., Rigaud, T. & Raimond, R. 1999. Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species. *Heredity* **83**: 71-78.
- Marshall, J.A. & Haes, E.C.M. 1988. *Grasshoppers and allied insects of Great Britain and Ireland*. Harley Books (B.H. & A. Harley Ltd.), Colchester, England.
- Martin, C.M. & Wagner, W.E., Jr. 2010. Female field crickets incur increased parasitism risk when near preferred song. *Plos One* **5**: e9592.
- Martin, D., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefevre, P. 2010a. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**: 2462-2463.
- Martin, G., Delaunay, C., Braquart-Varnier, C. & Azzouna, A. 2010b. Prophage Elements From the Endosymbiont, *Wolbachia* Hertig, 1936 Transferred To the Host Genome of the Woodlouse, *Armadillidium Vulgare* Latreille, 1804 (peracarida, Isopoda). *Crustaceana* **83**: 539-548.
- Martínez-Rodríguez, P., Granero-Belinchón, R., Arroyo-Yebras, F. & Bella, J.L. 2013a. *Wolbachia* incidence variation during host's life cycle can alter bacteria spread. *Submitted*.
- Martínez-Rodríguez, P., Hernández-Pérez, M. & Bella, J. 2013b. Detection of *Spiroplasma* and *Wolbachia* in the bacterial gonad community of *Chorthippus parallelus*. **In press**.
- Martínez-Rodríguez, P., Sarasa, J., Peco, B., Jauregui, B., Rivera, D. & Bella, J.L. 2013c. Endosymbiont-free ants: molecular biological evidence that neither *Wolbachia*, *Cardinium* or any other bacterial endosymbionts play a role in thelytokous parthenogenesis in the Harvester ant species, *Messor barbarus* and *M. capitatus*. *European Journal of Entomology*. **110**: 197-204.
- Martínez, P., Del Castillo, P. & Bella, J.L. 2009. Cytological detection of *Wolbachia* in squashed and paraffin embedded insect tissues. *Biotechnic & Histochemistry* **84**: 347-353.
- Martins, A.B., Ventura, I.M. & Klaczko, L.B. 2010. *Spiroplasma* infection in *Drosophila melanogaster*: What is the advantage of killing males? *Journal of Invertebrate Pathology* **105**: 145-150.
- Masly, J.P., Jones, C.D., Noor, M.A.F., Locke, J. & Orr, H.A. 2006. Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science* **313**: 1448-1450.

- Masui, S., Kamoda, S., Sasaki, T. & Ishikawa, H. 2000. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *Journal of Molecular Evolution* **51**: 491-497.
- Mateos, M., Castrezana, S.J., Nankivell, B.J., Estes, A.M., Markow, T.A. & Moran, N.A. 2006. Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics* **174**: 363-376.
- Maynard Smith, J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* **34**: 126-129.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species: From the Viewpoint of a Zoologist*. Columbia University Press, New York, USA.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*.
- McCutcheon, J.P., McDonald, B.R. & Moran, N.A. 2009. Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 15394-15399.
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N. & O'Neill, S.L. 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **268**: 2565-2570.
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N. & O'Neill, S.L. 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 2918-2923.
- McDermott, S.R. & Noor, M. A. F. 2011. Genetics of hybrid male sterility among strains and species in the *Drosophila pseudoobscura* species group. *Evolution* **65**: 1969–1978
- Meiklejohn, C.D., Holmbeck, M.A., Siddiq, M.A., Abt, D.N., Rand, D.M. & Montooth, K.L. 2013. An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in *Drosophila*. *PLoS Genet* **9**: e1003238.
- Meisel, R.P., Malone, J.H. & Clark, A.G. 2012. Faster-X Evolution of Gene Expression in *Drosophila*. *PLoS Genet* **8**: e1003013.
- Mercot, H. & Poinot, D. 2009. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies* **332**: 284-297.
- Michalak, P. 2009. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. *Heredity* **102**: 45-50.
- Moehring, A.J. 2011. Heterozygosity and its unexpected correlations with hybrid sterility. *Evolution* **65**: 2621–2630.
- Montenegro, H., Solferini, V.N., Klaczko, L.B. & Hurst, G.D.D. 2005. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* **14**: 281-287.
- Montenegro, H., Petherwick, A.S., Hurst, G.D.D. & Klaczko, L.B. 2006. Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **127**: 207-215.
- Moore, W.S. 1977. An Evaluation of Narrow Hybrid Zones in Vertebrates. *The Quarterly Review of Biology* **52**: 263-277.
- Moran, N.A. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: Natl Acad Sci, Arnold & Mabel Beckman Ctr.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A. 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**: 165-190.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E. & Sabree, Z.L. 2012. Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *Plos One* **7**: e36393.
- Morelli, G., Song, Y., Mazzoni, C.J., Eppinger, M., Roumagnac, P., Wagner, D.M., Feldkamp, M., Kusecek, B., Vogler, A.J., Li, Y., Cui, Y., Thomson, N.R., Jombart, T., Leblois, R., Lichtner, P., Rahalison, L., Petersen, J.M., Balloux, F., Keim, P., Wirth, T., Ravel, J., Yang, R., Carniel, E. & Achtman, M. 2010. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat Genet* **42**: 1140-1143.

- Morrison, D. & Ellis, J. 1997. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa. *Molecular Biological and Evolution* **14**: 428-441.
- Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M. & Vavre, F. 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology* **12**: 3459-3465.
- Mouton, L., Dedeine, F., Henri, H., Bouletreau, M., Profizi, N. & Vavre, F. 2004. Virulence multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia*-*Asobara tabida* symbiosis. *Genetics* **168**: 181-189.
- Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M. & Vavre, F. 2006. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology* **132**: 49-56.
- Mouton, L., Henri, H., Charif, D., Bouletrea, M. & Vavre, F. 2007. Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis. *Biology Letters* **3**: 210-213.
- Moya, A. & Peretó, J. 2011. *Simbiosis. Seres que evolucionan juntos*. Editorial Síntesis, Madrid, Spain.
- Muller, H.J. 1939. Reversibility in evolution considered from the standpoint of genetics. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **14**: 261-280.
- Muller, H.J. 1942. Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biol. Symposia* **6**: 71-125.
- Murdoch, W., Chesson, J. & Chesson, P. 1985. Biological control in theory and practice. *American Naturalist* **125**: 344-366.
- Naisbit, R.E., Jiggins, C.D., Linares, M., Salazar, C. & Mallet, J. 2002. Hybrid Sterility, Haldane's Rule and Speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. *Genetics* **161**: 1517-1526.
- Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R., Baptista, G., Parra, J., Zucchi, R., Alves, S., Vendramin, J., Marchini, L., Lopes, J. & Omoto, C. 2002. Entomologia Agrícola *Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz- FEALQ-Brasil*. **920**.
- Narita, S., Nomura, M. & Kageyama, D. 2007. Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain. *Fems Microbiology Ecology* **61**: 235-245.
- Neems, R.M. & Butlin, R.K. 1993. Divergence In Mate Finding Behavior Between 2 Subspecies of the Meadow Grasshopper *Chorthippus parallelus* (orthoptera, Acrididae). *Journal of Insect Behavior* **6**: 421-430.
- Nei, M. & Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* **3**: 418-426.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Nei, M. & Miller, J.C. 1990. A simple method for estimating averagenumber of nucleotide substitutions within and between populations from restrictiondata. *Genetics* **125**: 873-879.
- Nei, M. & Kumar, S., eds. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Nei, M. & Nozawa, M. 2011. Roles of Mutation and selection in speciation: from hugo de vries to the modern genomic era. *Genome Biology and Evolution* **3**: 812-829.
- Neter, J., Wasserman, W. & Whitmore, G.A. 1978. Applied statistics. Allyn and Bacon, Inc., Boston, MA.
- Nikoh, N., Tanaka, K., Shibata, F., Kondo, N., Hizume, M., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2008. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Research* **18**: 272-280.
- Noda, H., Koizumi, Y., Zhang, Q. & Deng, K.J. 2001a. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**: 727-737.



- Noda, H., Miyoshi, T., Zhang, Q., Watanabe, K., Deng, K. & Hoshizaki, S. 2001b. *Wolbachia* infection shared among planthoppers (*Homoptera* : *Delphacidae*) and their endoparasite (*Strepsiptera* : *Elenchidae*): a probable case of interspecies transmission. *Molecular Ecology* **10**: 2101-2106.
- Noda, H., Miyoshi, T. & Koizumi, Y. 2002. In vitro cultivation of *Wolbachia* in insect and mammalian cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-animal* **38**: 423-427.
- Nosil, P. & Schluter, D. 2011. The genes underlying the process of speciation. *Trends in ecology & evolution*: **26**: 160-167.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Nieves Aldrey, J.L. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* **53**: 47-67.
- Nylander, J.A.A., U. Olsson, P. Alström & Sanmartín, I. 2008. Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: A Bayesian approach to dispersal- vicariance analysis of the thrushes (Aves: Turdus). *Systematic Biology* **57**: 257-268.
- Obbard, D.J., Welch, J.J., Kim, K.-W. & Jiggins, F.M. 2009. Quantifying adaptive evolution in the *Drosophila* immune system. *PLoS Genet* **5**: e1000698.
- Oberauner, L., Zachow, C., Lackner, S., Högenauer, C., Smolle, K.-H. & Berg, G. 2013. The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing. *Sci. Rep.* **3**.
- Ochman, H. & Wilson, A.C. 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Molec. Evol.* **26**: 74-86.
- Ochman, H., Elwyn, S. & Moran, N.A. 1999. Calibrating bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 12638-12643.
- Ohara, J. & Wood, D. 2004. Catalogue of the Tachinidae (Diptera) of America north of Mexico. *Memoirs on Entomology, International* **18**: 410.
- Olsen, L.E. & Hoy, M.A. 2002. Heat curing *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Phytoseiidae) of a fitness-reducing microsporidium. *Journal of Invertebrate Pathology* **79**: 173-178.
- ONEILL, S.L., Pettigrew, M.M., Sinkins, S.P., Braig, H.R., Andreadis, T.G. & Tesh, R.B. 1997. In vitro cultivation of *Wolbachia* pipientis in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Molecular Biology* **6**: 33-39.
- Orr, H.A. 1993. Haldane's rule has multiple genetic causes. *Nature* **361**: 532-533.
- Orr, H.A. & Betancourt, A.J. 2001. Haldane's Sieve and Adaptation From the Standing Genetic Variation. *Genetics* **157**: 875-884.
- Orr, H.A. 2005. The genetic basis of reproductive isolation: Insights from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6522-6526.
- Ortiz-Barrientos, D., Counterman, B.A. & Noor, M.A.F. 2004. The genetics of speciation by reinforcement. *PLoS Biol.* **2**: e416.
- Ortiz-Barrientos, D., Greal, A. & Nosil, P. 2009. The Genetics and Ecology of Reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1168**: 156-182.
- Ouedraogo, R.M., Cusson, M., Goettel, M.S. & Brodeur, J. 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology* **82**: 103-109.
- Padidam, M., Sawyer, S. & Fauquet, C. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**: 218-225. .
- Page, R. & Holmes, E. 1998. *Molecular Evolution: a Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Publishing, USA.
- Palumbi, S.R. 2008. Speciation and the evolution of gamete recognition genes: pattern and process. *Heredity* **102**: 66-76.
- Paraskevopoulos, C., Bordenstein, S., Wernegreen, J., Werren, J. & Bourtzis, K. 2006. Toward a *Wolbachia* Multilocus Sequence Typing System: Discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Current Microbiology* **53**: 388-395.



- Pattengale, N., Alipour, M., Bininda-Emonds, O., Moret, B. & Stamatakis, A. 2010. How many bootstrap replicates are necessary? *J Comput Biol* **17**: 337-354.
- Pérez-Lezaun, A., Calafell, F., Comas, D., Mateu, E., Bosch, E., Martínez-Arias, R., Clarimón, J., Fiori, G., Luiselli, D., Facchini, F., Pettener, D. & Bertranpetit, J. 1999. Sex-specific migration patterns in central asian populations, revealed by analysis of Y-chromosome short tandem repeats and mtDNA. *Am J Hum Genet* **65**: 208–219.
- Pérez-Losada, M., Viscidi, R.P., Demma, J.C., Zenilman, J. & Crandall, K.A. 2005. Population Genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence community using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1887-1902.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Schönhuber, W. & Amann, R.I. 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*. J. Paul, ed., pp. 207-210. Academic Press Ltd, London, UK.
- Perrot-Minnot, M.J., Guo, L.R. & Werren, J.H. 1996. Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: Effects on compatibility. *Genetics* **143**: 961-972.
- Peters, J.L., Zhuravlev, Y.N., Fefelov, I., Humphries, E.M. & Omland, K.E. 2008. Multilocus phylogeography of a holarctic duck: colonization of north america from eurasia by gadwall (*Anas strepera*). *Evolution* **62**: 1769-1483.
- Philippe, H., Zhou, Y., Brinkmann, H., Rodrigue, N. & Delsuc, F. 2005. Heterotachy and long-branch attraction in phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* **5**: 50.
- Philips, M.L. 1983. Parasitism of the common earwig *Forficula auricularia* (Dermaptera: Forficulidae) by tachinid flies in an apple orchard. *Entomophaga* **28**: 89-96.
- Pires, A.C.C., Cleary, D.F.R., Almeida, A., Cunha, Â., Dealtry, S., Mendonça-Hagler, L.C.S., Smalla, K. & Gomes, N.C.M. 2012. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented Archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 5520-5528.
- Pita, M., Orellana, J., Martínez-Rodríguez, P., Martínez-Ramírez, Á., Fernández-Calvín, B. & Bella, J.L. 2013. FISH methods in cytogenetic studies. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. In press. (J. M. Walker, ed. Humana Press.
- Plantard, O., Rasplus, J.Y., Mondor, G., Le Clainche, I. & Solignac, M. 1998. *Wolbachia*-induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissima* (Giraud) (Hymenoptera: Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host. *Proc Biol Sci.* **265**: 1075–1080.
- Poinar Jr, G. & Buckley, R. 2006. Nematode (Nematoda: Mermithidae) and hairworm (Nematomorpha: Chordodidae) parasites in Early Cretaceous amber. *Journal of Invertebrate Pathology* **93**: 36-41.
- Popoff, M.Y., Bockemuhl, J. & Brenner, F.W. 1998. Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **149**: 601-604.
- Posada, D. & Crandall, K. 2001a. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst. Biol* **50**: 580–601.
- Posada, D. & Crandall, K. 2001b. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 13757-13762. .
- Posada, D. & Crandall, K.A. 2001c. Selecting Models of Nucleotide Substitution: An Application to Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution* **18**: 897-906.
- Posada, D., Crandall, K. & Holmes, E. 2002. Recombination in evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet* **36**: 75–97.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.



- Posada, D. 2009. Selecting models of evolution. In: *The phylogenetic handbook* (P. Lemey, M. Salemi & A. Vandarme, eds), pp. 345-361. Cambridge University Press, Cambridge.
- Poulin, R. 1995. Hairworms (Nematomorpha: Gordioidea) infecting New Zealand short-horned grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *J Parasitol* **81**: 121-122.
- Presgraves, D. 2010. The molecular evolutionary basis of species formation. *Nat Rev Genet* **11**: 175-180.
- Pritchard, J.K., Stephens, I.M. & Donnelly, P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**.
- Puttaraju, H.P. & Prakash, B.M. 2005a. Effects of *Wolbachia*-targeted tetracycline on a host-parasitoid-symbiont interaction. *European Journal of Entomology* **102**: 669-674.
- Puttaraju, H.P. & Prakash, B.M. 2005b. Effects of *Wolbachia* in the uzifly, *Exorista sorbillans*, a parasitoid of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science* **5**: 30.
- Puttegowda, P.H. & Madhu, M.M. 2001. Cytological evidence for *Wolbachia* infection in *Exorista sorbillans* (Diptera : Tachinidae), a serious endoparasite of *Bombyx mori* L. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 325A-326A.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-65.
- R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. , R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Raghavendra, K., Barik, T., Reddy, B., Sharma, P. & Dash, A. 2011. Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research* **108**: 757-779.
- Rajaram, B. & Rajulu, G. 1975. A study of the cuticle of *Gordius robustus*, a nematomorph worm. *Acta Histochem* **54**: 257-271.
- Rambaut, A. & Drummond, A. 2009. Tracer v1.4, <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rances, E., Voronin, D., Tran-Van, V. & Mavingui, P. 2008. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *Journal of Bacteriology* **190**: 5020-5030.
- Ranz, J.M., Namgyal, K., Gibson, G. & Hartl, D.L. 2004. Anomalies in the Expression Profile of Interspecific Hybrids of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genome Research* **14**: 373-379.
- Rasgon, J.L. & Scott, T.W. 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the californian *Culex pipiens* mosquito species complex: Parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* **165**: 2029-2038.
- Rasgon, J.L. & Scott, T.W. 2004. Phylogenetic characterization of *Wolbachia* symbionts infecting *Cimex-lectularius* L. and *Oeciacus vicarius* Horvath (Hemiptera : Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* **41**: 1175-1178.
- Rasgon, J.L., Cornel, A.J. & Scott, T.W. 2006a. Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 1603-1611.
- Rasgon, J.L., Gamston, C.E. & Ren, X. 2006b. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6934-6937.
- Raychoudhury, R., Baldo, L., Oliveira, D.C.S.G. & Werren, J.H. 2009. Modes of acquisition of *Wolbachia*: Horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence In the *Nasonia* Species Complex. *Evolution* **63**: 165-183.

- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- Reed, K.M. & Werren, J.H. 1995. Induction of Paternal Genome Loss By the Paternal-sex-ratio Chromosome and Cytoplasmic Incompatibility Bacteria (*Wolbachia*) - A Comparative-study of Early Embryonic Events. *Molecular Reproduction and Development* **40**: 408-418.
- Reno, M.L., Held, N.L., Fields, C.J., Burke, P.V. & Whitaker, R.J. 2009. Biogeography of the *Sulfolobus islandicus* pan-genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 8605-8610.
- Reuter, M. & Keller, L. 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 748-753.
- Reuter, M., Pedersen, J.S. & Keller, L. 2004. Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. *Heredity* **94**: 364-369.
- Reynolds, K.T. & Hoffmann, A.A. 2002. Male age, host effects and the weak expression or nonexpression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genetical Research* **80**: 79-87.
- Reynolds, K.T., Thomson, L.J. & Hoffmann, A.A. 2003. The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain popcorn in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **164**: 1027-1034.
- Richard, F.J., Bonnenfant, P., Beauché, F., Olivier, L., Debenest, C., Sicard, M. & Bouchon, D. 2012. Sexual selection in terrestrial isopods: Smelling from *Wolbachia*. 7th International *Wolbachia* conference, St Pierre d'Oléron, France.
- Ridley, M. 2004. *Evolution*. Blackwell Scientific Publishing, Malden, Massachusetts, USA.
- Riegler, M., Sidhu, M., Miller, W.J. & O'Neill, S.L. 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* **15**: 1428-1433.
- Rieseberg, L.H. & Blackman, B.K. 2010. Speciation genes in plants. *Annals of Botany* **106**: 439-455.
- Rigaud, T. & Juchault, P. 1995. Success and Failure of Horizontal Transfers of Feminizing *Wolbachia* Endosymbionts In Woodlice. *Journal of Evolutionary Biology* **8**: 249-255.
- Rigaud, T. & Juchault, P. 1998. Sterile intersexuality in an isopod induced by the interaction between a bacterium (*Wolbachia*) and the environment. *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne De Zoologie* **76**: 493-499.
- Rigaud, T., Pennings, P.S. & Juchault, P. 2001. *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. *Journal of Invertebrate Pathology* **77**: 251-257.
- Ritchie, M.G., Butlin, R.K. & Hewitt, G.M. 1989. Assortative Mating Across A Hybrid Zone In *Chorthippus-parallelus* (orthoptera, Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology* **2**: 339-352.
- Ritchie, M.G. 1990. Are differences in song responsible for assortative mating between subspecies of the grasshopper *Chorthippus-parallelus* (orthoptera, Acrididae). *Animal Behaviour* **39**: 685-691.
- Rodriguero, M.S., Lanteri, A.A. & Confalonieri, V.A. 2010. Mito-nuclear genetic comparison in a *Wolbachia* infected weevil: insights on reproductive mode, infection age and evolutionary forces shaping genetic variation. *Bmc Evolutionary Biology* **10**: 340.
- Rolán-Alvarez, E. 2007. Sympatric speciation as a by-product of ecological adaptation in the Galician *Littorina saxatilis* hybrid zone. *Journal of Molluscan Studies* **73**: 1-10.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Ronquist, F. 2012. Sistemática: reconstruir el árbol de la vida. In: *El árbol de la vida: Sistemática y evolución de los seres vivos* (P. Vargas & R. Zardoya, eds). Museo de Ciencias Naturales, Madrid.



- Ros, V.I.D. & Breeuwer, J.A.J. 2009. The effects of, and interactions between, *Cardinium* and *Wolbachia* in the doubly infected spider mite *Bryobia sarothamni*. *Heredity* **102**: 413-422.
- Ros, V.I.D., Fleming, V.M., Feil, E.J. & Breeuwer, J.A.J. 2009. How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1036-1043.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. & Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **250**: 91-98.
- Russel, J. & Moran, N. 2005. Horizontal transfer of bacterial symbionts: heritability and fitness effects in a novel aphid host. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7987 - 7994.
- Russell, J.A., Latorre, A., Sabater-Munoz, B., Moya, A. & Moran, N.A. 2003. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology* **12**: 1061-1075.
- Russell, J.A. & Moran, N.A. 2005. Horizontal transfer of bacterial symbionts: Heritability and fitness effects in a novel aphid host. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7987-7994.
- Russell, J., Goldman-Huertas, B., Moreau, C., Baldo, L., Stahlhut, J., Werren, J. & Pierce, N. 2009. Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. *Evolution* **63**: 624-640.
- Sabree, Z.L., Hansen, A.K. & Moran, N.A. 2012. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *Plos One* **7**: e41250.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sakamoto, J.M. & Rasgon, J.L. 2006. Geographic distribution of *Wolbachia* infections in *Cimex lectularius* (Heteroptera : Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* **43**: 696-700.
- Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., Meng, X.Y. & Fukatsu, T. 2005. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4069-4075.
- Salminen, M. & Martin, D. 2009. Detecting and characterizing individual recombination events. In: *The phylogenetic handbook* (P. Lemey, M. Salemi & A. Vandarme, eds), pp. 519-548. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sanderson, N. 1989. Can gene flow prevent reinforcement? . *Evolution* **43**: 223-235.
- Sant'Anna, M.R.V., Darby, A.C., Brazil, R.P., Montoya-Lerma, J., Dillon, V.M., Bates, P.A. & Dillon, R.J. 2012. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *Plos One* **7**: e42531.
- Sarasa, J. 2013. La zona híbrida pirenaica de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera). *Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid*. Madrid.
- Sarasa, J., Bernal, A., Fernández-Calvín, B. & Bella, J.L. 2013. *Wolbachia* Induced Cytogenetical Effects as Evidenced in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera). *Cytogenet Genome Res* **139**: 36-43.
- Saridaki, A. & Bourtzis, K. 2010. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 67-72.
- Schierup, M.H. & Hein, J. 2000. Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics* **156**: 879-891.
- Schilthuizen, M. & Gittenberger, E. 1994. Parallel evolution of an hybridzyme in hybrid zones in *Albinaria hippolyti* (Boettger). *Heredity* **73**: 244-248.

- Schilthuizen, M. & Stouthamer, R. 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **264**: 361-366.
- Schilthuizen, M., Hoekstra, R.F. & Gittenberger, E. 1999. Selective increase of a rare haplotype in a land snail hybrid zone. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 2181-2185.
- Schilthuizen, M., Hoekstra, R.F. & Gittenberger, E. 2001. The 'rare allele phenomenon' in a ribosomal spacer. *Molecular Ecology* **10**: 1341-1345.
- Schilthuizen, M., Giesbers, M.C.W.G., Beukeboom, L.W. 2011. Haldane's rule in the 21st century. *Heredity* **107**: 95-102
- Schilthuizen, M. & Lammers, Y. 2013. Hybrid zones, barrier loci and the 'rare allele phenomenon'. *Journal of Evolutionary Biology* **26**: 288-290.
- Schmidt-Rhaesa, A. 1997. Nematomorpha. In: *Süßwasserfauna Mitteleuropas* (J. Scwoerbel & P. Zwick, eds), pp. 1-124. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Schmidt, H. & von Haeseler, A. 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. In: *The phylogenetic handbook* (P. Lemey, M. Salemi & A. Vandarme, eds), pp. 181-209. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M. & von Haeseler, A. 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**: 502-504.
- Schneider, D.I., Chao, T., Ehrman, L., Däuble, W., Kaltenpoth, M. & Miller, W.J. 2012. *the impact of mutualistic Wolbachia on chemical communication and mate choice in the Drosophila paulistorum species complex*. 7th International *Wolbachia* conference, St Pierre d'Oléron, France.
- Schuler, H., Arthofer, W., Riegler, M., Bertheau, C., Krumboeck, S., Koeppler, K., Vogt, H., Teixeira, L.A.F. & Stauffer, C. 2011. Multiple *Wolbachia* infections in *Rhagoletis pomonella*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **139**: 138-144.
- Schwarz, D., Shoemaker, K., Botteri, N. & McPherson, B. 2007. A novel preference for an invasive plant as a mechanism for animal hybrid speciation. *Evolution* **61**: 245-256.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimensions of a model. *Ann. Stat.* **6**: 461-464.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* **19**: 198-207.
- Serbus, L.R., Casper-Lindley, C., Landmann, F. & Sullivan, W. 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-Host interactions. *Annual Review of Genetics* **42**: 683-707.
- Serrano, L. 1994. Zonas híbridas: El laboratorio natural de Portalet (Pirineo Oscense). *Departamento de Biología*, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
- Serrano, L., delaVega, C.G., Bella, J.L., Lopez-Fernandez, C., Hewitt, G.M. & Gosálvez, J. 1996. A hybrid zone between two subspecies of *Chorthippus parallelus*. X-chromosome variation through a contact zone. *Journal of Evolutionary Biology* **9**: 173-184.
- Sharon, G., Segal, D., Ringo, J.M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I. & Rosenberg, E. 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 20051-20056.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of Log-Likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1114.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M. 2001. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* **17**: 1246-1247.
- Shimodaira, H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology* **51**: 492-508.
- Shoemaker, D., Ross, K., Keller, L., Vargo, E. & Werren, J. 2000. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect Mol Biol.* **9**: 661-673.

- Shoemaker, D.D., Katju, V. & Jaenike, J. 1999. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophilla recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* **53**: 1157-1164.
- Shoemaker, D.D., Machado, C.A., Molbo, D., Werren, J.H., Windsor, D.M. & Herre, E.A. 2002. The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* **269**: 2257-2267.
- Shoemaker, D.D., Keller, G. & Ross, K.G. 2003. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. *Molecular Ecology* **12**: 1757-1771.
- Shuker, D., King, T., Bella, J. & Butlin, R. 2005a. The genetic basis of speciation in a grasshopper hybrid zone. In: *Insect Evolutionary Biology* (H. G. Fellowes M, Roff J, ed., pp. 427-454. CABI Publishing, Oxford University Press, Wallingford, Oxon, UK.
- Shuker, D.M., Underwood, K., King, T.M. & Butlin, R.K. 2005b. Patterns of male sterility in a grasshopper hybrid zone imply accumulation of hybrid incompatibilities without selection. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences* **272**: 2491-2497.
- Simonsen, K.L., Churchill, G.A. & Aquadro, C.F. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics* **141**: 413-429.
- Sintupachee, S., Milne, J.R., Poonchaisri, S., Baimai, V. & Kittayapong, P. 2006. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial Ecology* **51**: 294-301.
- Siozios, S., Sapountzis, P., Ioannidis, P. & Bourtzis, K. 2008. *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insect Science* **15**: 89-100.
- Slatkin, M. 1975. Gene flow and selection in a two-locus system. *Genetics* **81**: 787-802.
- Slatko, B., Taylor, M. & Foster, J. 2010. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis* **51**: 55-65.
- Slothouber Galbreath, J.G.M., Smith, J.E., Becnel, J.J., Butlin, R.K. & Dunn, A.M. 2010. Reduction in post-invasion genetic diversity in *Crangonyx pseudogracilis* (Amphipoda: Crustacea): a genetic bottleneck or the work of hitchhiking vertically transmitted microparasites? *Biological Invasions* **12**: 191-209.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. & Spratt, B.G. 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 4384-4388.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy, Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. WH Freeman eds., USA.
- Sokal, R. & Rohlf, F., eds. 2012. *Biometry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 561-588.
- Soto, A. 2002. Nuevo registro de parasitoide del picudo de los cítricos (*Compsus* n. sp) en Colombia. *Boletín FITOTECNIA* **60**.
- Soto, A. & Ocampo, A. 2011. Estudio preliminar de *Trigonospila* sp. (diptera: tachinidae), parasitoide de *Compsus viridilineatus* (coleoptera: curculionidae). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural Universidad de Caldas* **15**.
- Souza-Egipsy, V., Gonzalez-Toril, E., Zettler, E., Amaral-Zettler, L., Aguilera, A. & Amils, R. 2008. Prokaryotic community structure in algal photosynthetic biofilms from extreme acidic streams in Rio Tinto (Huelva, Spain) *International Microbiology* **11**: 251-260.
- Springate, S. & Thomas, M.B. 2005. Thermal biology of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*, and the implications for resistance to disease. *Ecological Entomology* **30**: 724-732.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. & Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the



- species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1043-1047.
- Stahlhut, J.K., Desjardins, C.A., Clark, M.E., Baldo, L., Russell, J.A., Werren, J.H. & Jaenike, J. 2010. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Molecular Ecology* **19**: 1940-1952.
- Staley, J.T. 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **361**: 1899-1909.
- Staley, J.T. 2009. The phylogenomic species concept for Bacteria and Archaea. *Microbe* **4**: 361-365.
- Stamatakis, A. 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688-2690.
- Stamatakis, A., Blagojevic, F., Nikolopoulos, D.S. & Antonopoulos, C.D. 2007. Exploring new search algorithms and hardware for phylogenetics: RAXML meets the IBM Cell. *J. VLSI Signal Process. Syst.* **48**: 271-286.
- Stanley, H.F., Casey, S., Carnahan, J.M., Goodman, S., Harwood, J. & Wayne, R.K. 1996. Worldwide patterns of mitochondrial DNA differentiation in the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Mol. Biol. Evol.* **13**: 368-382.
- Stevens, L., Giordano, R. & Fialho, R.F. 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**: 519-545.
- Stireman, J. & Singer, M. 2003. What determines host range in parasitoids? An analysis of a tachinid parasitoid community. *Oecologia* **135**: 629-638.
- Stireman, J. 2008. alpha and beta diversity of a tachinid parasitoid community over space and time. *Annals of the Entomological Society of America* **101**: 362-370.
- Strasburg, J.L. 2001. Adaptive Divergence in Sunflowers. In: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Sun, X.-J., Xiao, J.-H., Cook, J.M., Feng, G. & Huang, D.-W. 2011. Comparisons of host mitochondrial, nuclear and endosymbiont bacterial genes reveal cryptic fig wasp species and the effects of *Wolbachia* on host mtDNA evolution and diversity. *Bmc Evolutionary Biology* **11**: 86.
- Suzuki, Y., Glazko, G.V. & Nei, M. 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 16138-16143.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G. & Cosson, J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- Tamas, I., Klasson, L., Canbäck, B., Näslund, A.K., Eriksson, A.-S., Wernegreen, J.J., Sandström, J.P., Moran, N.A. & Andersson, S.G.E. 2002. 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. *Science* **296**: 2376-2379.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, Vol. 17, pp. 57-86. Amer Mathematical Society.
- Telschow, A., Hammerstein, P. & Werren, J.H. 2002a. The effect of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: Models with two-way migration. *American Naturalist* **160**: S54-S66.
- Telschow, A., Hammerstein, P. & Werren, J.H. 2002b. Effects of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: Mainland-island model. *Integrative and Comparative Biology* **42**: Soc Integrat & Comparat Biol.





- Telschow, A., Hammerstein, P. & Werren, J.H. 2005a. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* **59**: 1607-1619.
- Telschow, A., Yamamura, N. & Werren, J.H. 2005b. Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. *Journal of Theoretical Biology* **235**: 265-274.
- Telschow, A., Engelstadter, J., Yamamura, N., Hammerstein, P. & Hurst, G.D.D. 2006. Asymmetric gene flow and constraints on adaptation caused by sex ratio distorters. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 869-878.
- Telschow, A., Flor, M., Kobayashi, Y., Hammerstein, P. & Werren, J.H. 2007. *Wolbachia*-Induced Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility and Speciation: Mainland-Island Model. *Plos One* **2**: e701.
- Templeton, A.R., Routman, E. & Phillips, C.A. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* **140**: 767-782.
- Thao, M.L., Clark, M.A., Baumann, L., Brennan, E.B., Moran, N.A. & Baumann, P. 2000. Secondary Endosymbionts of Psyllids Have Been Acquired Multiple Times. *Current Microbiology* **41**: 300-304.
- Thao, M.L., Gullan, P.J. & Baumann, P. 2002. Secondary ( $\gamma$ -Proteobacteria) Endosymbionts Infect the Primary ( $\beta$ -Proteobacteria) Endosymbionts of Mealybugs Multiple Times and Coevolve with Their Hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3190-3197.
- Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P. & Renaud, F. 2002. Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 356-361.
- Thomas, M.B. & Blanford, S. 2003. Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 344-350.
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680. .
- Thompson, J.D., Plewniak, F. & Poch, O. 1999. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Research* **27**: 2682-2690.
- Thorne, G. 1940. The hairworm, *Gordius robustus* Leidy, as a parasite of the Mormon cricket, *Anabrus simplex* Haldeman. . *J Washington Acad Sci* **30**: 219-231.
- Thornton, K., Bachtrog, D. & Andolfatto, P. 2006. X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: No evidence for faster-X protein evolution. *Genome Research* **16**: 498-504.
- Tinsley, M.C. & Majerus, M.E.N. 2006a. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera : Coccinellidae). *Parasitology* **132**: 757-765.
- Tinsley, M.C. & Majerus, M.E.N. 2006b. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology* **132**: 757-765.
- Toju, H. & Fukatsu, T. 2011. Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Molecular Ecology* **20**: 853-868.
- Tortosa, P., Charlat, S., Labbe, P., Dehecq, J.-S., Barre, H. & Weill, M. 2010. *Wolbachia* Age-Sex-Specific Density in *Aedes albopictus*: A Host Evolutionary Response to Cytoplasmic Incompatibility? *Plos One* **5**: e9700.
- Tram, U. & Sullivan, W. 2002. Rote of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* **296**: 1124-1126.

- Tram, U., Fredrick, K., Werren, J.H. & Sullivan, W. 2006. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *Journal of Cell Science* **119**: 3655-3663.
- Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J. & Haas, R. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* **46**: 608-614.
- Tregenza, T. & Wedell, N. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited Review. *Molecular Ecology* **9**: 1013-1027.
- Tully, J.G., Rose, D.L., Yunker, C.E., Carle, P., Bové, J.M., Williamson, D.L. & Whitcomb, R.F. 1995. *Spiroplasma ixodetis* sp. nov., a New Species from *Ixodes pacificus* Ticks Collected in Oregon. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 23-28.
- Turelli, M. & Hoffmann, A.A. 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* **353**: 440-442.
- Turelli, M. 1994. Evolution of Incompatibility-inducing Microbes and Their Hosts. *Evolution* **48**: 1500-1513.
- Turelli, M. & Hoffmann, A.A. 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* dynamics and parameter estimates from natural-populations. *Genetics* **140**: 1319-1338.
- Turelli, M. 2010. Cytoplasmic Incompatibility In Populations With Overlapping Generations. *Evolution* **64**: 232-241.
- Urwin, R. & Maiden, M.C.J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* **11**: 479-487.
- Uvarov, B. 1966. *Grasshoppers and Locusts, a Handbook of General Acridology*. The Syndics of Cambridge University Press Cambridge.
- Vala, F., Weeks, A., Claessen, D., Breeuwer, J.A.J. & Sabelis, M.W. 2002. Within- and between-population variation for *Wolbachia*-induced reproductive incompatibility in a haplodiploid mite. *Evolution* **56**: 1331-1339.
- van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H. & Tibayrenc, M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 547-560.
- van Ham, R.C.H.J., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernández, J.M., Jiménez, L., Postigo, M., Silva, F.J., Tamames, J., Viguera, E., Latorre, A., Valencia, A., Morán, F. & Moya, A. 2003. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 581-586.
- van Meer, M.M.M., Witteveldt, J. & Stouthamer, R. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the wsp gene. *Insect Molecular Biology* **8**: 399-408.
- Van Opijnen, T. & Breeuwer, J.A.J. 1999. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Experimental and Applied Acarology* **23**: 871-881.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* **60**: 407-438.
- Vargas, P. & Zardoya, R., eds. 2012. *Arbol de la vida, el - sistematica y evolucion de los seres vivos*. Museo Nac. Ciencias Naturales Madrid.
- Varley, G., Gradwell, G. & Hassell, M. 1973. *Insect population biology*. Blackwell, Oxford, England.
- Vautrin, E., Charles, S., Genieys, S. & Vavre, F. 2007. Evolution and invasion dynamics of multiple infections with *Wolbachia* investigated using matrix based models. *Journal of Theoretical Biology* **245**: 197-209.
- Vautrin, E., Genieys, S., Charles, S. & Vavre, F. 2008. Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 145-161.

- Vautrin, E. & Vavre, F. 2009. Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends In Microbiology* **17**: 95-99.
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1711-1723.
- Vavre, F., Fleury, F., Varaldi, J., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: Epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* **54**: 191-200.
- Vavre, F., Fleury, F., Varaldi, J., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 2002. Infection polymorphism and cytoplasmic incompatibility in Hymenoptera-*Wolbachia* associations. *Heredity* **88**: 361-365.
- Vavre, F., Fouillet, P. & Fleury, F. 2003. Between- and within-host species selection on cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* in haplodiploids. *Evolution* **57**: 421-427.
- Vavre, F., Mouton, L. & Pannebakker, B.A. 2009. *Drosophila*-Parasitoid communities as model systems for host-*Wolbachia* Interactions. *Advances In Parasitology, Vol 70: Parasitoids of Drosophila* **70**: 299-331.
- Ventura, I., Martins, A., Lyra, M., Andrade, C.C., Carvalho, K. & Klaczko, L. 2012. *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster* Populations: Prevalence, Male-Killing, Molecular Identification, and No Association with *Wolbachia*. *Microbial Ecology* **64**: 794-801.
- Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. & Grandjean, F. 2007. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* **397**: 58-66.
- Virdee, S.R. & Hewitt, G.M. 1992. Postzygotic isolation and haldane rule in a Grasshopper. *Heredity* **69**: 527-538.
- Virdee, S.R. & Hewitt, G.M. 1994. Clines for hybrid dysfunction in a grasshopper hybrid zone. *Evolution* **48**: 392-407.
- Von der Schulenburg, J.H.G., Majerus, T.M.O., Dorzhu, C.M., Zakharov, I.A., Hurst, G.D.D. & Majerus, M.E.N. 2000. Evolution of male-killing *Spiroplasma* (Procaryotae: Mollicutes) inferred from ribosomal spacer sequences. *The Journal of General and Applied Microbiology* **46**: 95-98.
- Wade, M.J. & Chang, N.W. 1995. Increased male-fertility in *Tribolium confusum* Beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature* **373**: 72-74.
- Wade, M.J. 2001. Evolution - Infectious speciation. *Nature* **409**: 675-677.
- Wagner, W. & Basolo, A. 2007. Host preferences in a phonotactic parasitoid of field crickets: the relative importance of host song characters. *Ecological Entomology* **32**: 478-484.
- Wallin, I.E. 1927. *Symbioticism and the origin of species*. Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA.
- Wang, Y., Gilbreath, T.M., III, Kukutla, P., Yan, G. & Xu, J. 2011. Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *Plos One* **6**: e24767.
- Watanabe, M., Tagami, Y., Miura, K., Kageyama, D. & Stouthamer, R. 2012. Distribution Patterns of *Wolbachia* Endosymbionts in the Closely Related Flower Bugs of the Genus *Orius*: Implications for Coevolution and Horizontal Transfer. *Microbial Ecology* **64**: 537-545.
- Waters, J.M., Fraser, C.I., Hewitt, G.M. 2013. Founder takes all: density-dependent processes structure biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 78-85.
- Watterson, G. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* **7**: 256-276.
- Watts, T., Haselkorn, T.S., Moran, N.A. & Markow, T.A. 2009a. Variable Incidence of *Spiroplasma* Infections in Natural Populations of *Drosophila* Species. *Plos One* **4**: e5703.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. & Truper, H.G. Report of the Ad-Hoc-Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 463-464.

- Webster, G., Embley, T.M. & Prosser, J.I. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of beta-proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 20-30.
- Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T. & Hoffmann, A.A. 2007. From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *Plos Biology* **5**: 997-1005.
- Weiller, G. 1998. Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol Biol Evol* **15**: 326-335. .
- Weinert, L.A., Tinsley, M.C., Temperley, M. & Jiggins, F.M. 2007. Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles. *Biology Letters* **3**: 678-681.
- Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N. & Jiggins, F.M. 2009. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. *Bmc Biology* **7**: 6.
- Werren, J. 1997. Biology of *Wolbachia*. . *Annual Review of Entomology* **42**: 587-609.
- Werren, J.H., Zhang, W. & Guo, L.R. 1995. Evolution and Phylogeny of *Wolbachia* - Reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **261**: 55-63.
- Werren, J.H. & Bartos, J.D. 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Current Biology* **11**: 431-435.
- Werren, J.H., Baldo, L. & Clark, M.E. 2008a. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 741-751.
- West, S.A., Cook, J.M., Werren, J.H. & Godfray, H.C.J. 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Molecular Ecology* **7**: 1457-1465.
- White, J.A., Kelly, S.E., Perlman, S.J. & Hunter, M.S. 2009. Cytoplasmic incompatibility in the parasitic wasp *Encarsia inaron*: disentangling the roles of *Cardinium* and *Wolbachia* symbionts. *Heredity* **102**: 483-489.
- White, M.J.D. 1978. *Modes of speciation*. W. H. Freeman.
- White, M.J.D., Dennis, E.S., Honeycutt, R.L., Contreras, N. & Peacock, W.J. 1982. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warrama bavirgo* and its bisexual relatives IX. The ribosomal RNA cistron. *Chromosoma* **85**: 181-199.
- Whitney, K., Randell, R. & Rieseberg, L. 2010. Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus*. *New Phytol* **187**: 230-239.
- Wiedenbeck, J. & Cohan, F.M. 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 957-976.
- Wilson, E. 1927. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association* **22**: 209-212.
- Wilson, M.R. & Claridge, M.F. 1991. *Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of rice*. CABI, Wallingford.
- Wiwatanaratnabutr, S. & Kittayapong, P. 2006. Effects of temephos and temperature on *Wolbachia* load and life history traits of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology* **20**: 300-307.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J. & Fox, G.E. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. . *Syst. Appl. Microbiology* **6**: 143-151.
- Wojcieszek, J.M. & Simmons, L.W. 2013. Divergence in genital morphology may contribute to mechanical reproductive isolation in a millipede. *Ecology and Evolution* **3**: 334-343.
- Wong, Z.S., Hedges, L.M., Brownlie, J.C. & Johnson, K.N. 2011. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. *PloS one* **6**: e25430.
- Wood, D. 1987. Tachinidae. In: *Manual of Nearctic Diptera*, Vol. 2 (J. McAlpine, B. Peterson, G. Shewell, H. Teskey, J. Vockeron & D. Wood, eds), pp. 1193-1269. Biosystematics Research Institute. , Ontario, Canada.

- Woodruff, D. 1989. Genetic anomalies associated with Cerion hybrid zones: the origin and maintenance of new electrophoretic variants called hybridzymes. *Biological Journal of the Linnean Society* **36**: 281-294.
- Wu, C. & Ting, C. 2004. Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics* **5**: 114-122.
- Wu, C.I. & Davis, A.W. 1993. Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *American Naturalist* **142**: 187-212.
- Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Madupu, R., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Mohamoud, Y., Lee, P., Berry, K., Young, M.B., Utterback, T., Weidman, J., Nierman, W.C., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin, H., O'Neill, S.L. & Eisen, J.A. 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *Plos Biology* **2**: e69.
- Xi, Z.Y., Dean, J.L., Khoo, C. & Dobson, S.L. 2005. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 903-910.
- Xia, X. 2001. *Data analysis in molecular biology and evolution*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Xia, X. & Z., X. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**: 371-373.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. & Wang, Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 1-7.
- Xia, X. & Lemey, P. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. In: *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny* (P. Lemey, M. Salemi & A. Vandarme, eds), pp. 615-630. Cambridge University Press.
- Xie, R.-R., Zhou, L.-L., Zhao, Z.-J. & Hong, X.-Y. 2010. Male age influences the strength of Cardinium-induced cytoplasmic incompatibility expression in the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus*. *Applied Entomology and Zoology* **45**: 417-423.
- Yamada, R., Floate, K.D., Riegler, M. & O'Nein, S.L. 2007. Male development time influences the strength of *Wolbachia*-Induced cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **177**: 801-808.
- Yang, C.-C., Yu, Y.-C., Valles, S.M., Oi, D.H., Chen, Y.-C., Shoemaker, D., Wu, W.-J. & Shih, C.-J. 2010. Loss of microbial (pathogen) infections associated with recent invasions of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*. *Biological Invasions* **12**: 3307-3318.
- Yang, Z. & Rannala, B. 2005. Branch-Length prior influences bayesian posterior probability of phylogeny. *Systematic Biology* **54**: 455-470.
- Yang, Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1586-1591.
- Yang, Z. & Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* **13**: 303-314.
- Yun, Y., Lei, C., Peng, Y., Liu, F., Chen, J. & Chen, L. 2011. *Wolbachia* Strains Typing in Different Geographic Population Spider, *Hylyphantes Graminicola* (Linyphiidae). *Current Microbiology* **62**: 139-145.
- Zabal-Aguirre, M., Arroyo, F. & Bella, J.L. 2010. Distribution of *Wolbachia* infection in *Chorthippus parallelus* populations within and beyond a Pyrenean hybrid zone. *Heredity* **104**: 174-184.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y. & Coll, M. 2000. *Wolbachia* density and host fitness components in Muscidifurax uniraptor (Hymenoptera : Pteromalidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **75**: 267-272.
- Zchori-Fein, E. & Perlman, S.J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* **13**: 2009-2016.



- Zeh, D.W., Zeh, J.A. & Bonilla, M.M. 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity* **95**: 41-49.
- Zeisset, I. & Beebee, T.J.C. 2001. Determination of biogeographical range: an application of molecular phylogeography to the European pool frog *Rana lessonae*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **268**: 933-938.
- Zhou, Y., Zhang, Y.Q., Zhi, X.Y., Wang, X., Dong, J., Chen, Y., Lai, R. & Li, W.J. 2008. Description of *Sinobacter flavus* gen. nov., sp nov., and proposal of *Sinobacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 184-189.
- Zuckerkandl, E. & Pauling, L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins* (V. Bryson & H. J. Vogel, eds). Academic Press, USA.
- Zug, R. & Hammerstein, P. 2012. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *Plos One* **7**: e38544.
- Zug, R., Koehncke, A. & Hammerstein, P. 2012. Epidemiology in evolutionary time: the case of *Wolbachia* horizontal transmission between arthropod host species. *Journal of Evolutionary Biology*.

## **ANEXOS:**

## **ANEXO A: FIGURAS COMPLEMENTARIAS**

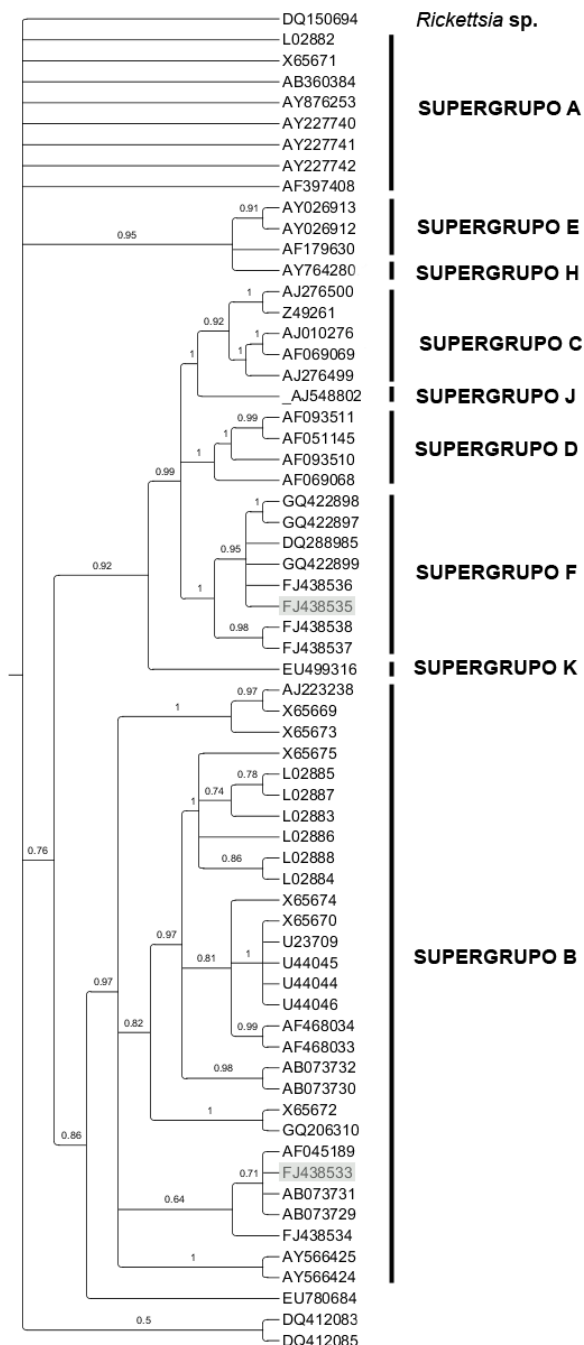


Fig. A1: Árbol filogenético (dendograma) no enraizado construido mediante inferencia bayesiana basado en secuencias del gen *16S rRNA* detectadas en Navafría y Sallent de Gállego (resaltado en gris). Puede comprobarse la pertenencia de los alelos con códigos de "genbank" FJ438535 y FJ438533 a los supergrupos F y B, respectivamente.



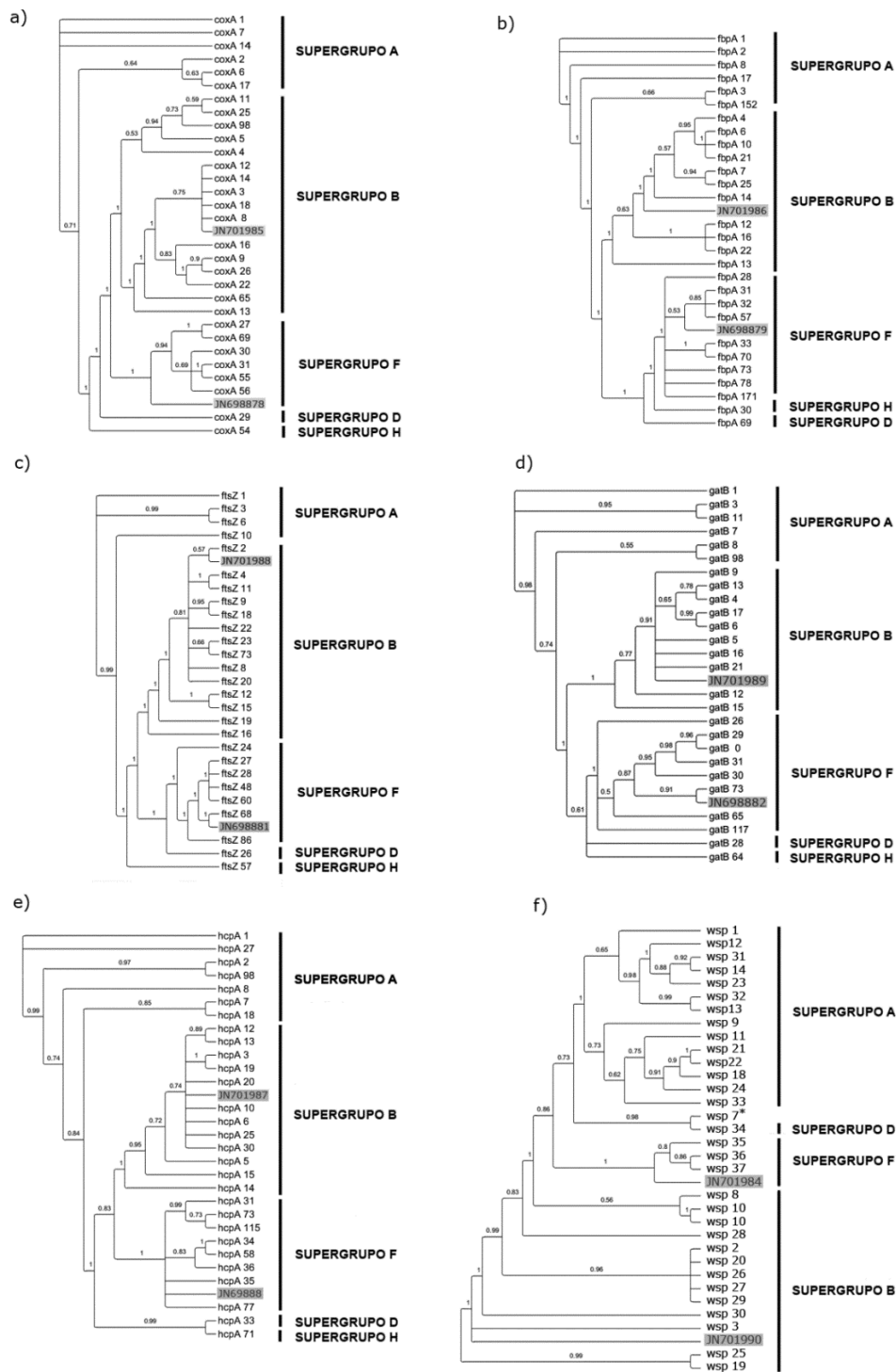


Fig. A2: Árboles filogenéticos (dendogramas) no enraizados construidos mediante inferencia bayesiana basados en las secuencias de los distintos genes que conforman el sistema de Clasificación Multi-locus de *Wolbachia* (a: *coxA*; b: *fbpA*; c: *ftsZ*; d: *gatB*; e: *hcpA*), así como el gen *wsp* (f). Puede comprobarse la adscripción de los alelos detectados a los supergrupos B y F (ver detalles en sección “FILOGENIA DE *WOLBACHIA*”).

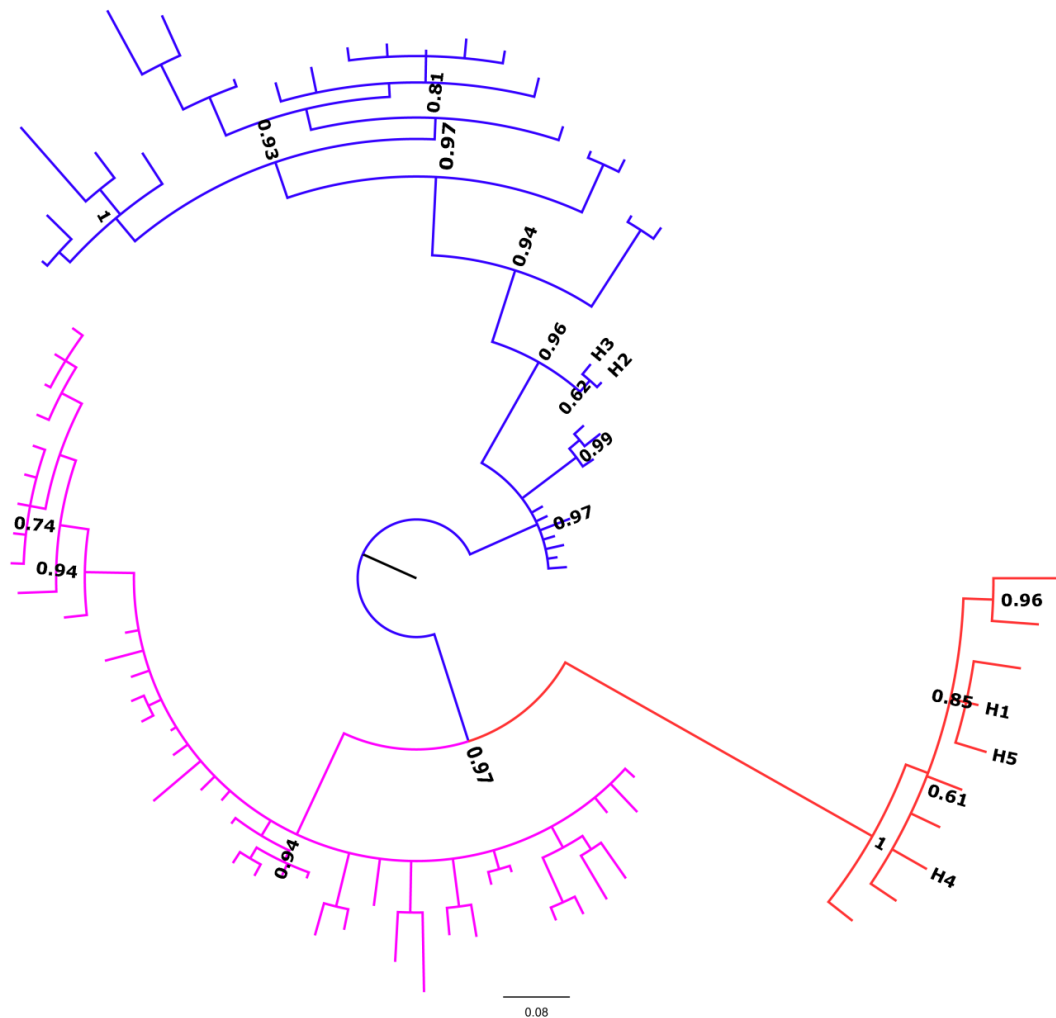


Fig. A3: Árbol filogenético no enraizado del gen *fbpA* de *Wolbachia*, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), y F (rojo). En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores.

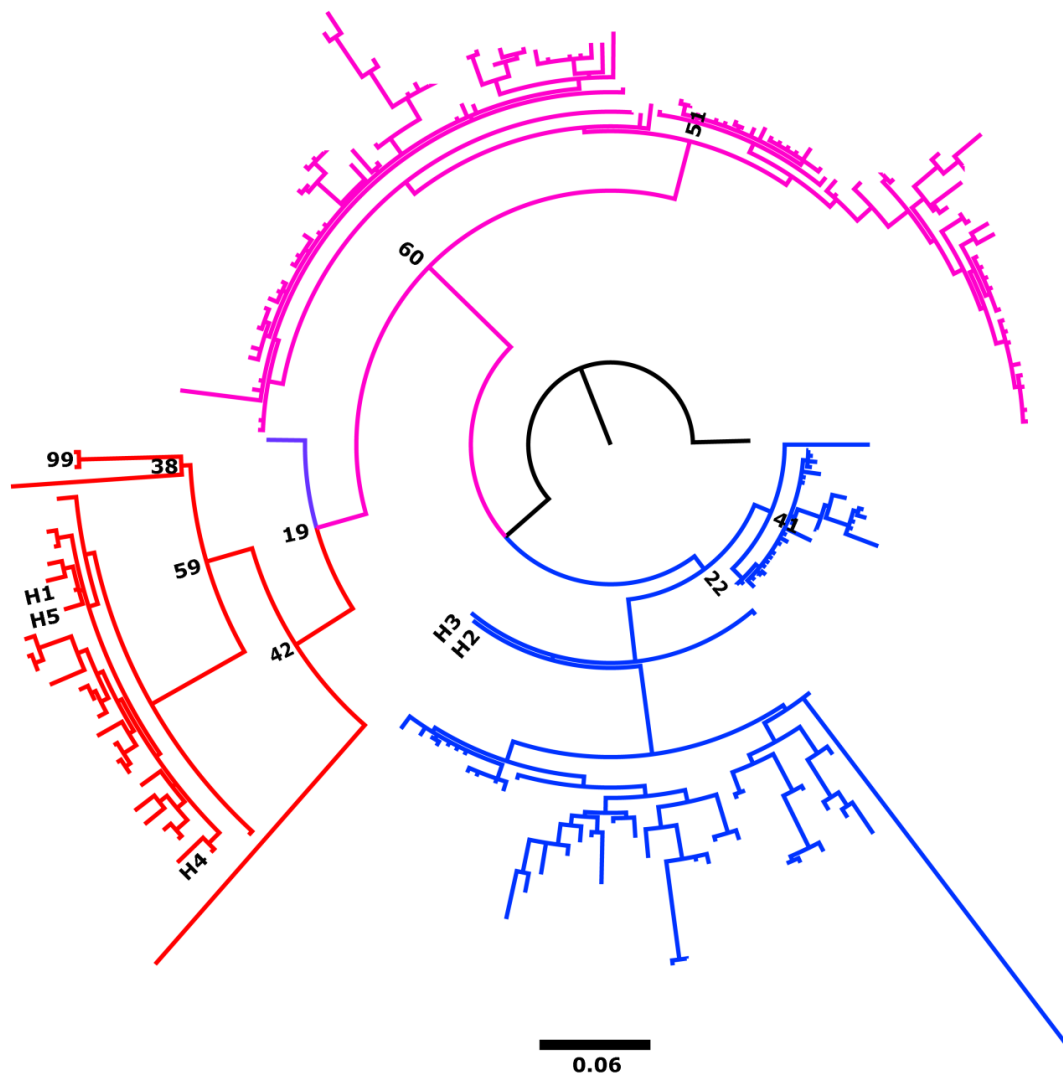


Fig. A4: Árbol filogenético no enraizado del gen *fbpA* de *Wolbachia*, obtenido mediante máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos.

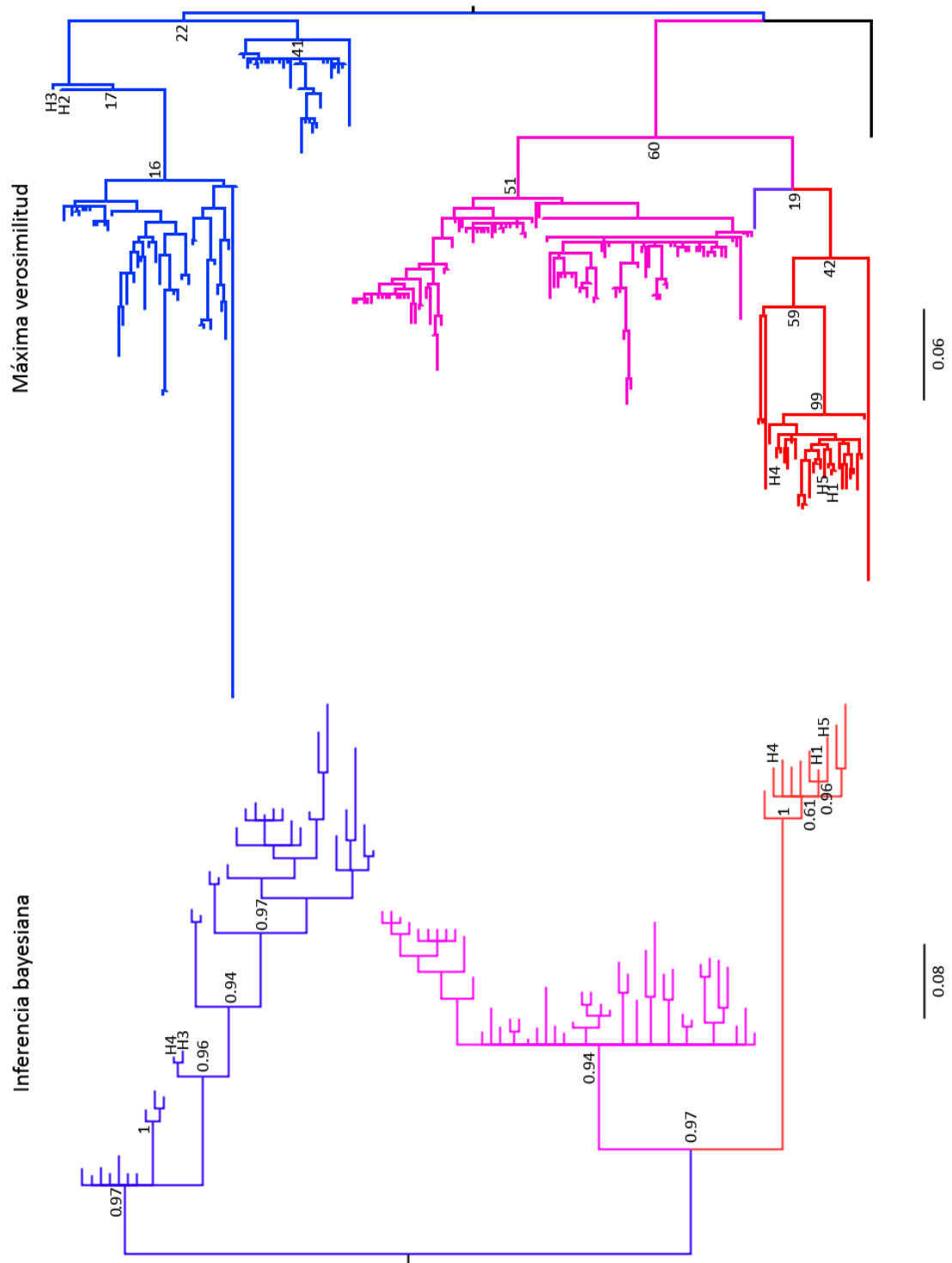


Fig. A5: Comparación de topologías entre el árbol filogenético reconstruido mediante inferencia bayesiana, y aquel reconstruido empleando máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H6. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). Debido a la incapacidad técnica de emplear el mismo número de OTUs en la inferencia mediante ML o IB, la comparación entre las topologías debe tomarse con cautela, siendo una comparativo *de visu*, y nunca con valor estadístico.

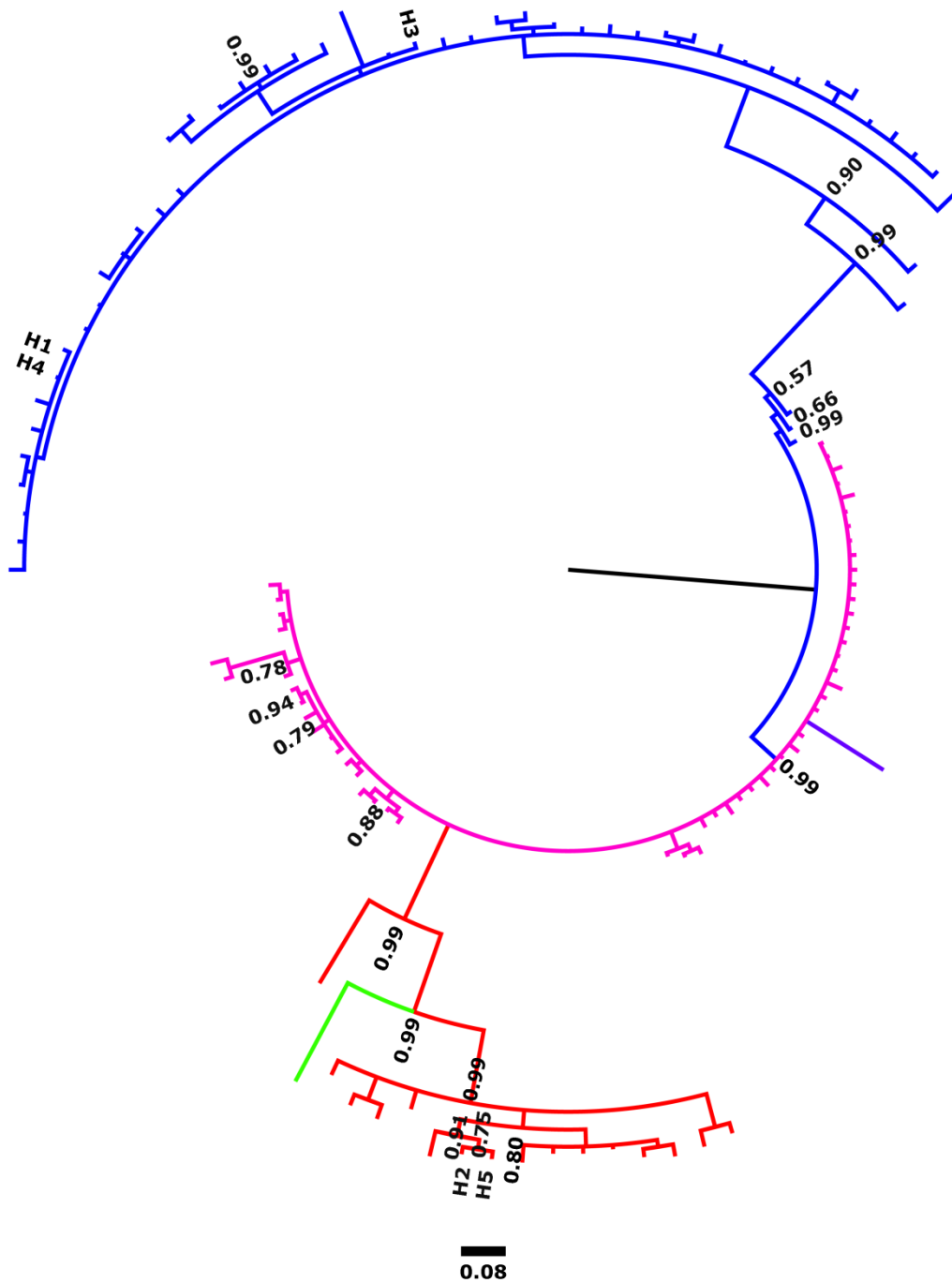


Fig. A6: Árbol filogenético no enraizado del gen *ftsZ* de *Wolbachia*, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde) y F (rojo). En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores

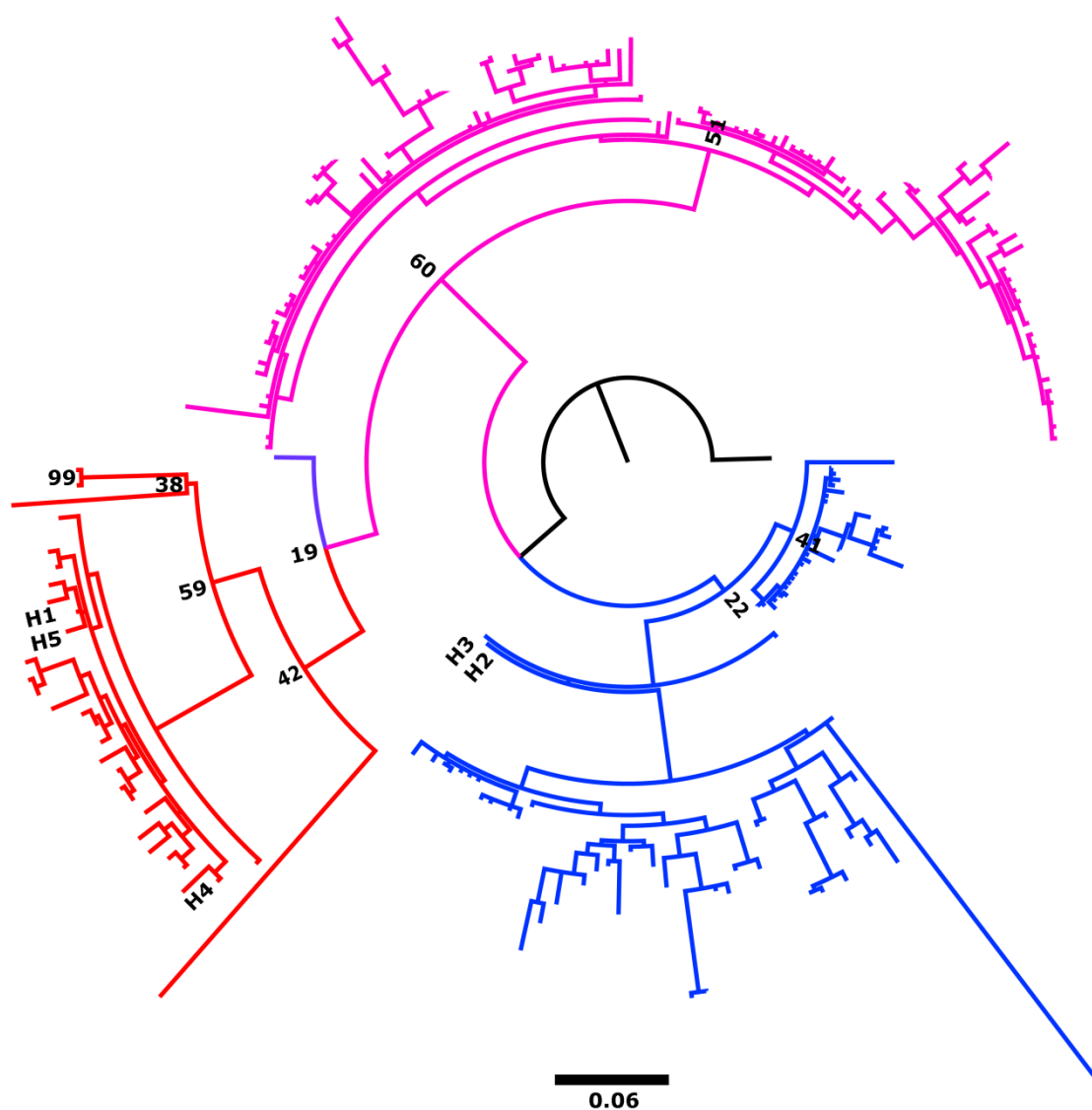


Fig. A7: Árbol filogenético no enraizado del gen *ftsZ* de *Wolbachia*, obtenido mediante máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos.

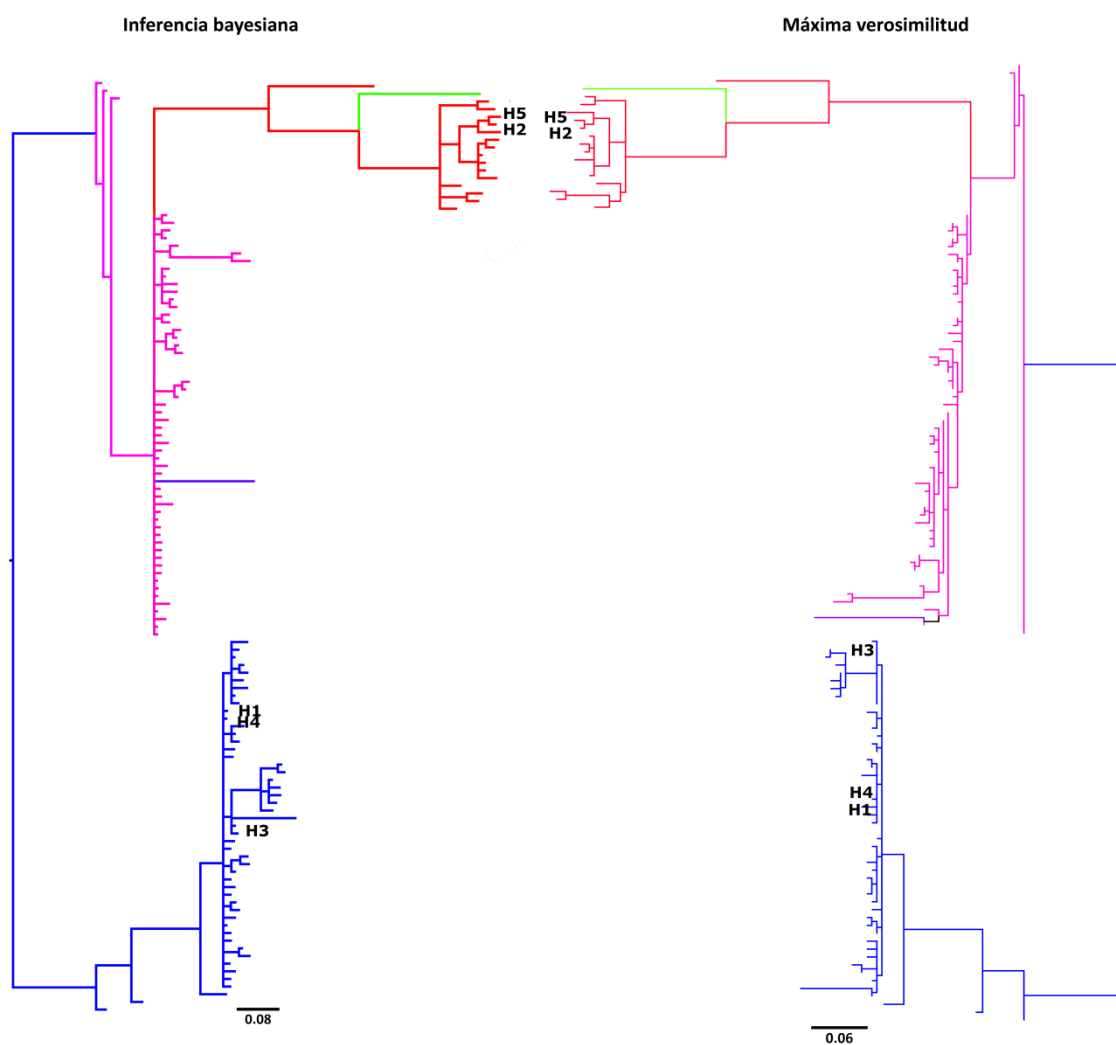


Fig. A8: Comparación de topologías entre el árbol filogenético reconstruido mediante inferencia bayesiana, y aquel reconstruido empleando máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), verde (D), F (rojo) y H (morado).

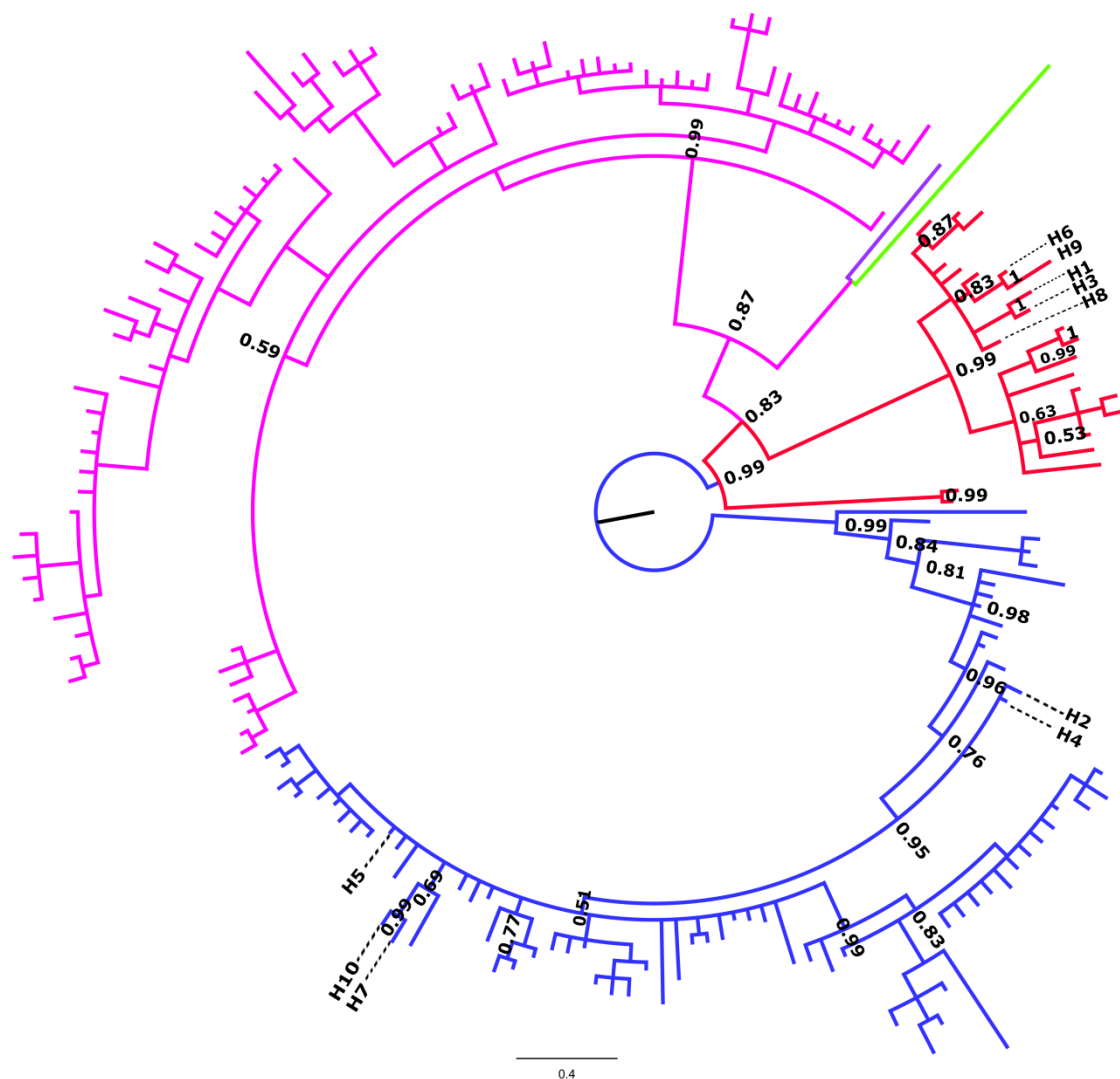


Fig. A9: Árbol filogenético no enraizado del gen *hcpA* de *Wolbachia*, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H10. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores.



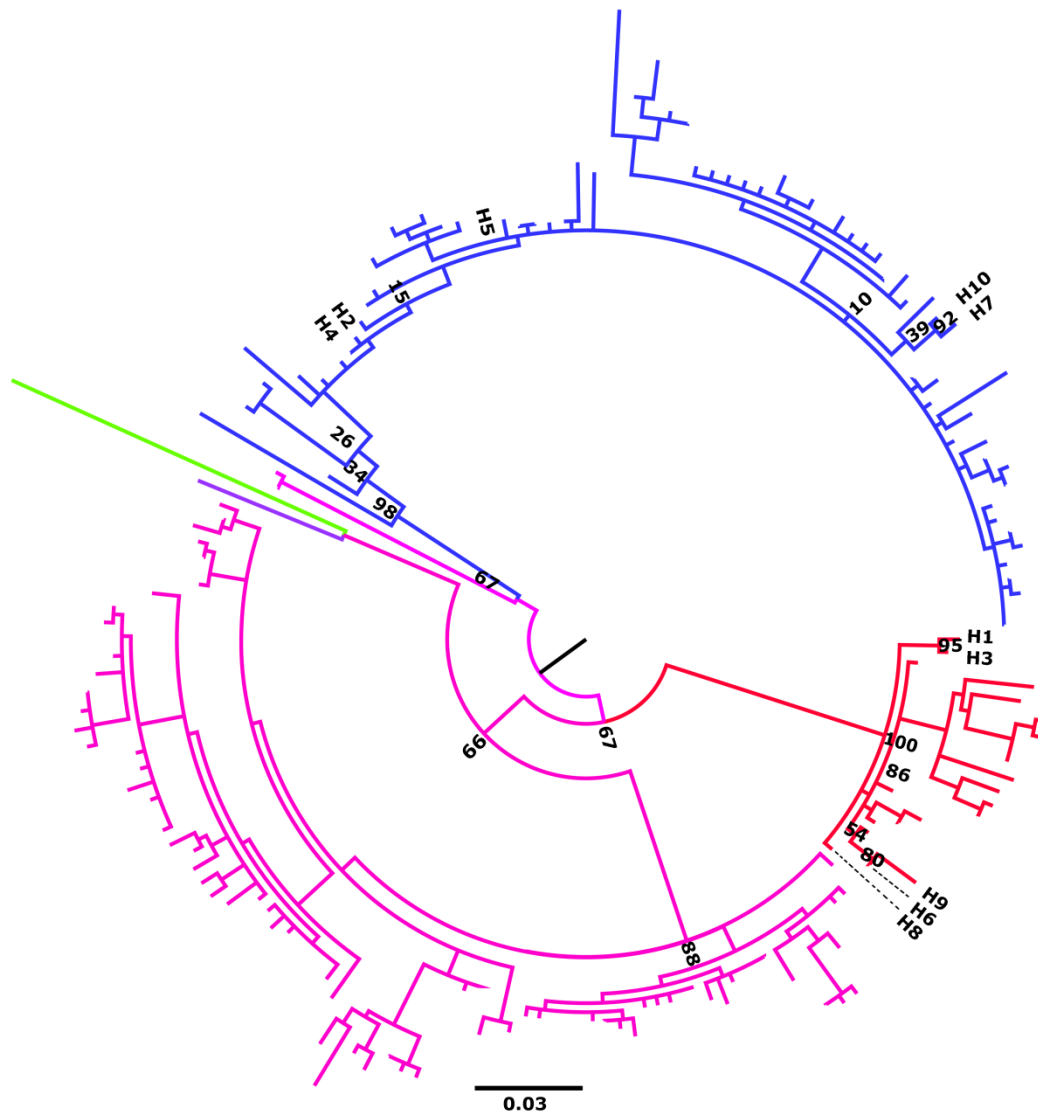


Fig. A10: Árbol filogenético no enraizado del gen *hcpA* de *Wolbachia*, obtenido mediante máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H10. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos

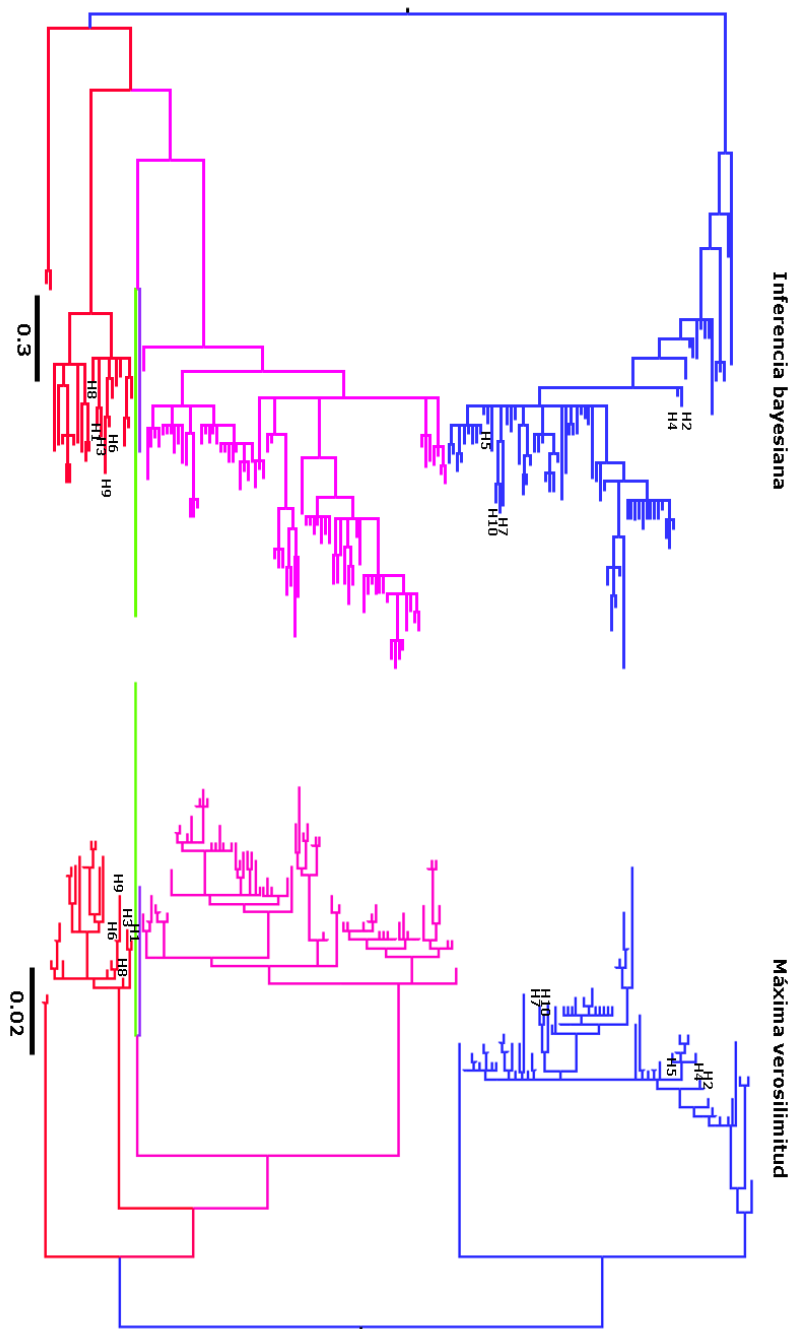


Fig. A11: Comparación de topologías entre el árbol filogenético reconstruido mediante inferencia bayesiana, y aquel reconstruido empleando máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H10. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado).

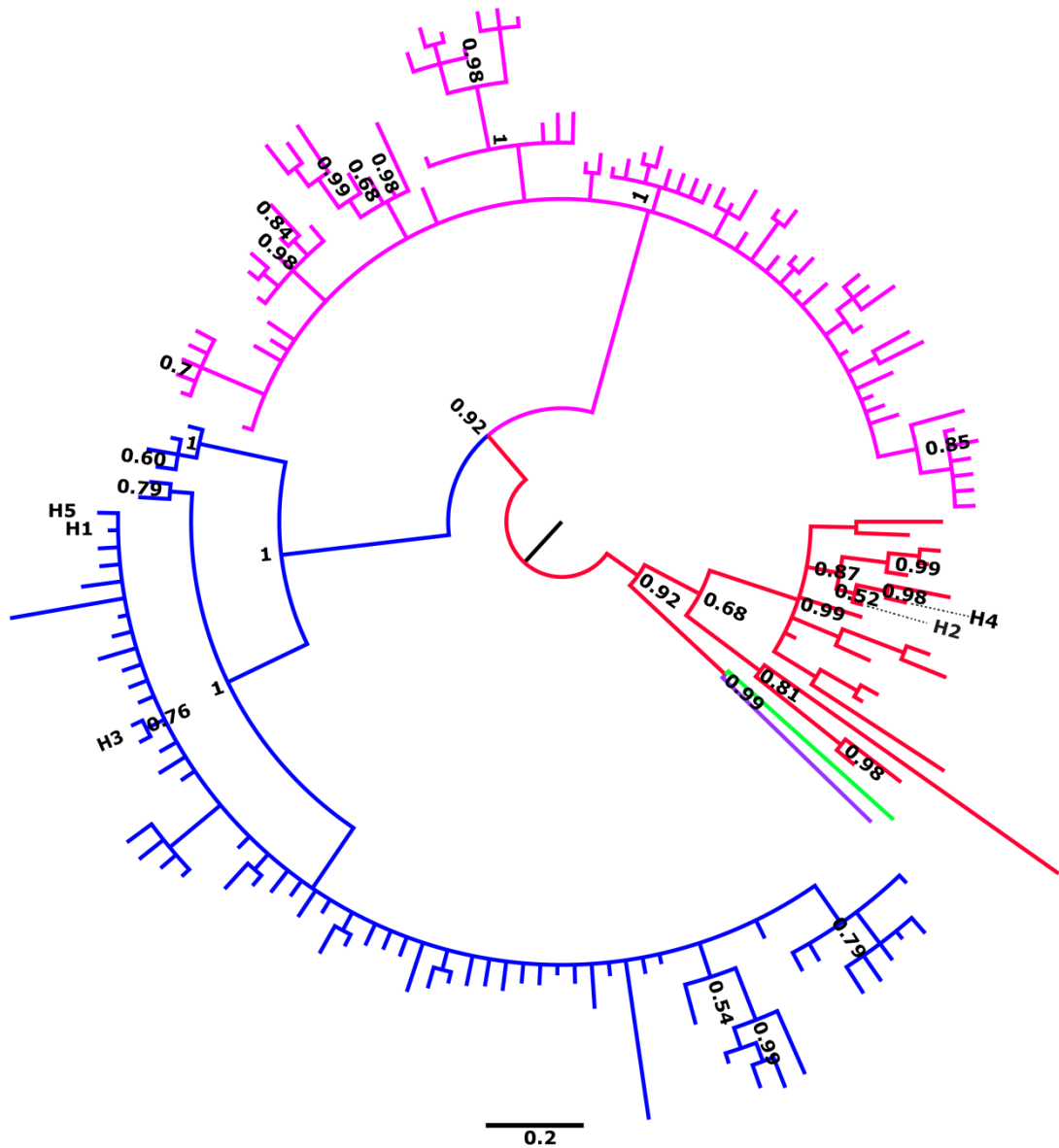


Fig. A12: Árbol filogenético no enraizado del gen *gatB* de *Wolbachia*, obtenido mediante inferencia bayesiana. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores obtenidos para las probabilidades posteriores.

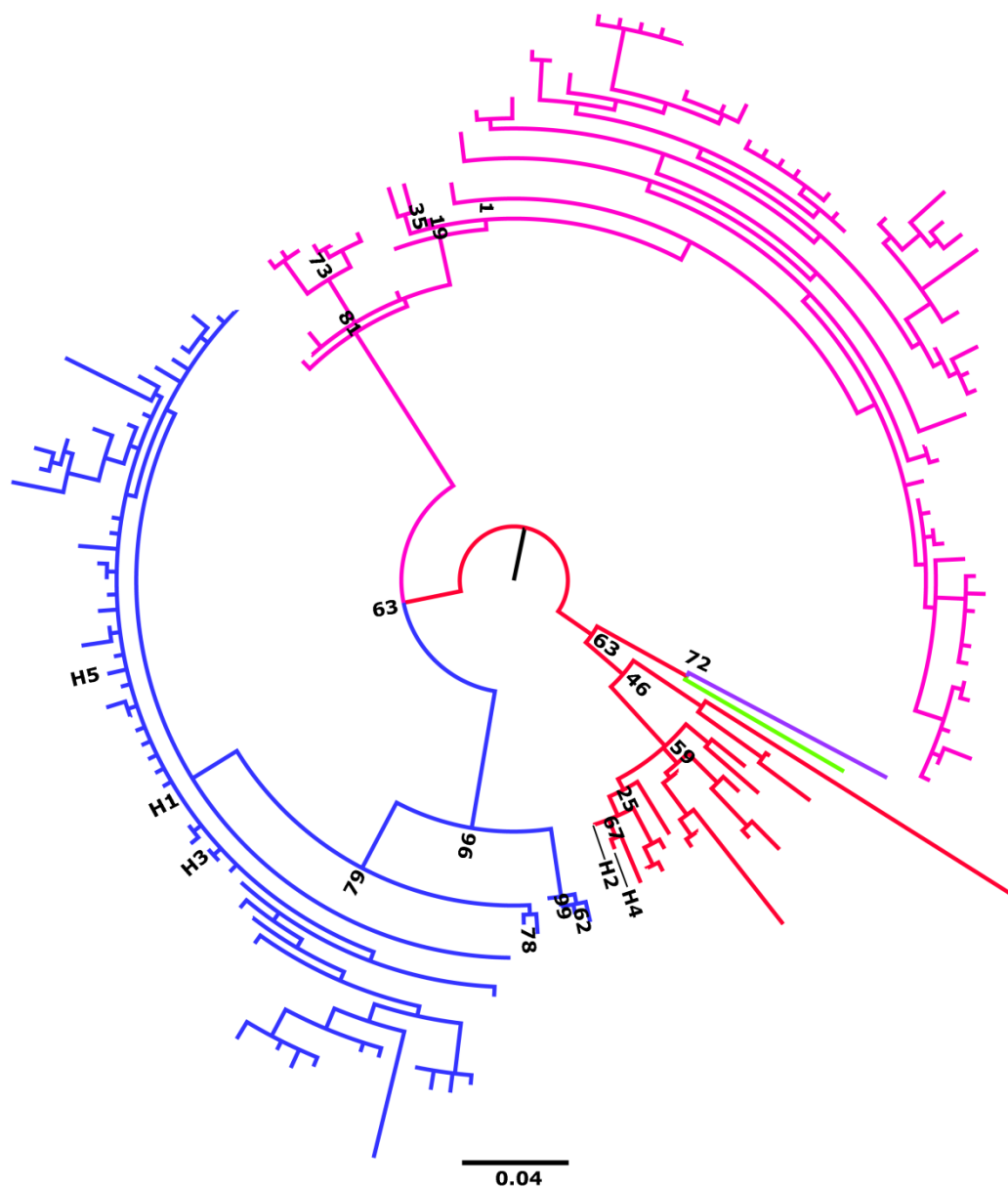


Fig. A13: Árbol filogenético no enraizado del gen *gatB* de *Wolbachia*, obtenido mediante máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos.

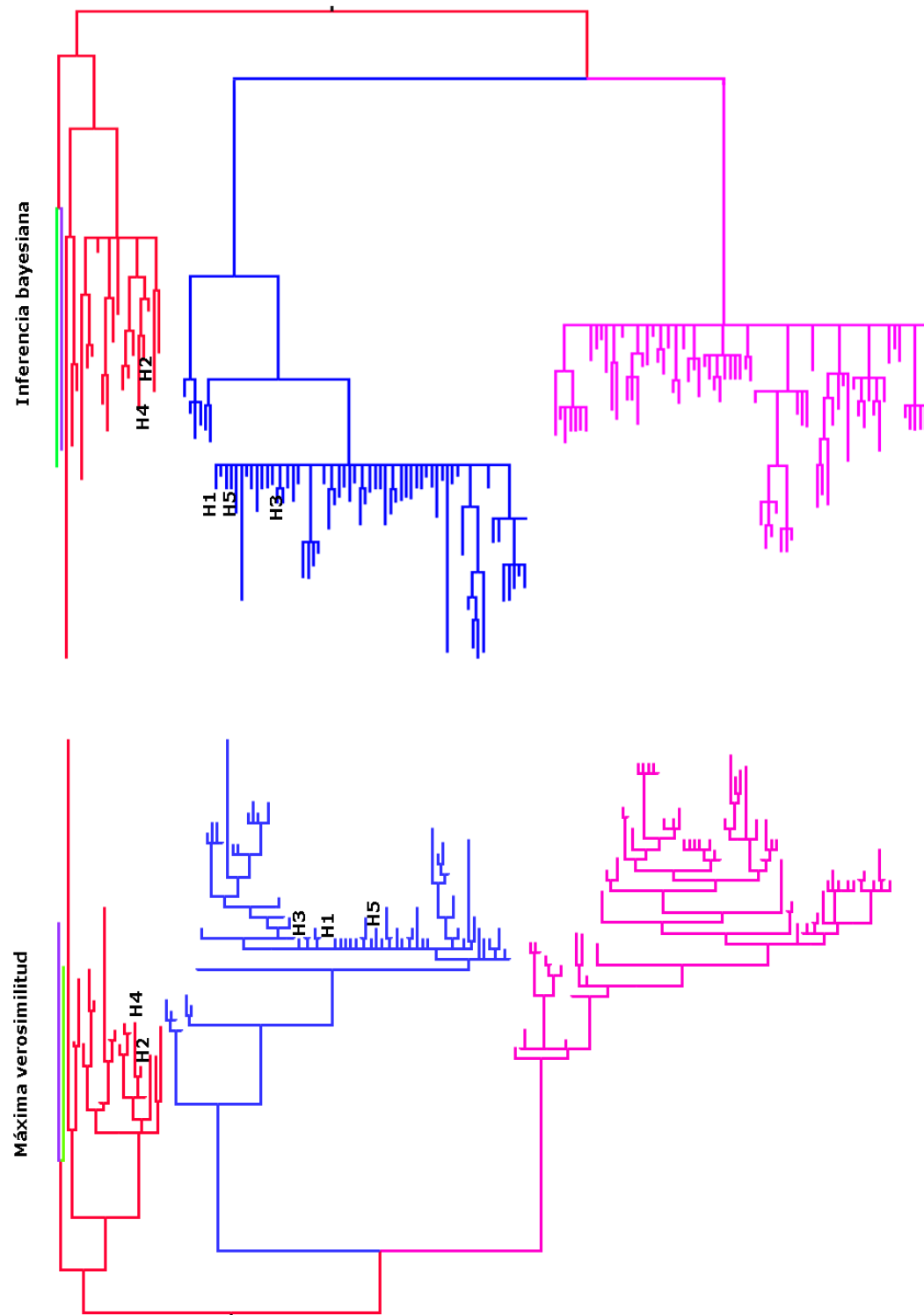


Fig. A14: Comparación de topologías entre el árbol filogenético reconstruido mediante inferencia bayesiana, y aquel reconstruido empleando máxima verosimilitud. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H5. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado).

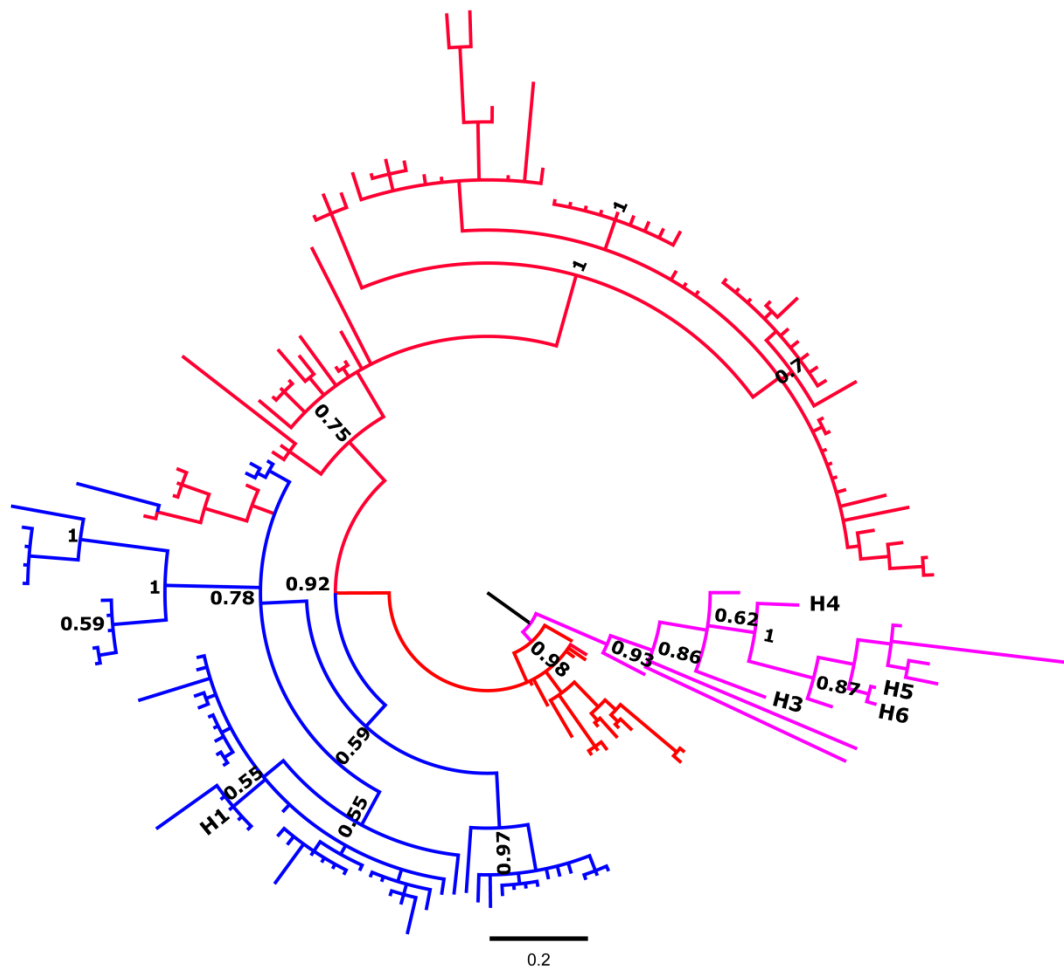


Fig. A15: Árbol filogenético no enraizado obtenido mediante inferencia bayesiana a partir de los alelos del gen *wsp* detectados en *C. parallelus*. Los alelos de este ortóptero son descritos como H1-H6. El código de colores significa supergrupo A (rosa), B (azul), y F (rojo). En los nodos se disponen los valores de las probabilidades posteriores obtenidas.

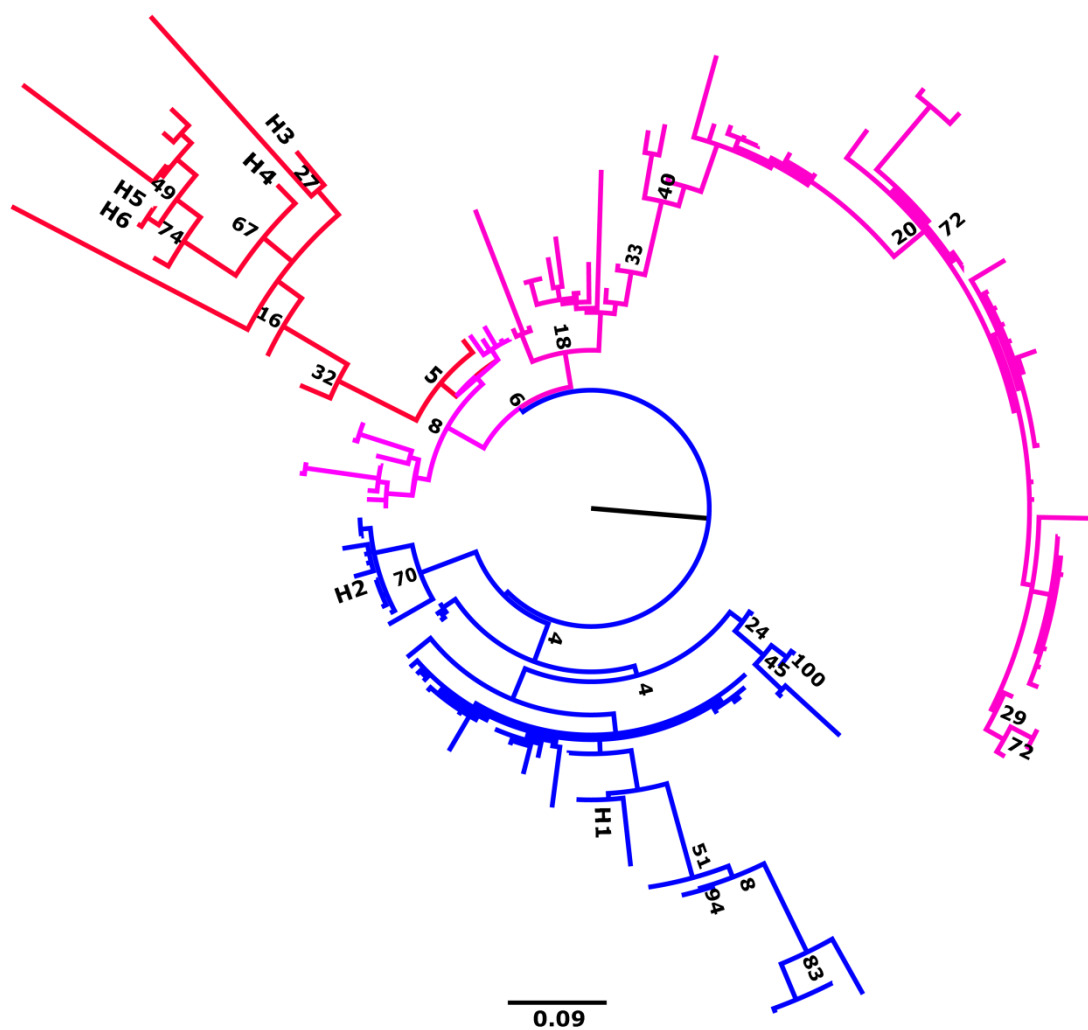


Fig. A16: Árbol filogenético no enraizado obtenido mediante máxima verosimilitud a partir de los alelos del gen *wsp* detectados en *C. parallelus*. Los alelos de este ortóptero son descritos como H1-H6. El código de colores significa supergrupo A (rosa), B (azul), yF (rojo). En los nodos se disponen los valores de *bootstrap* obtenidos.

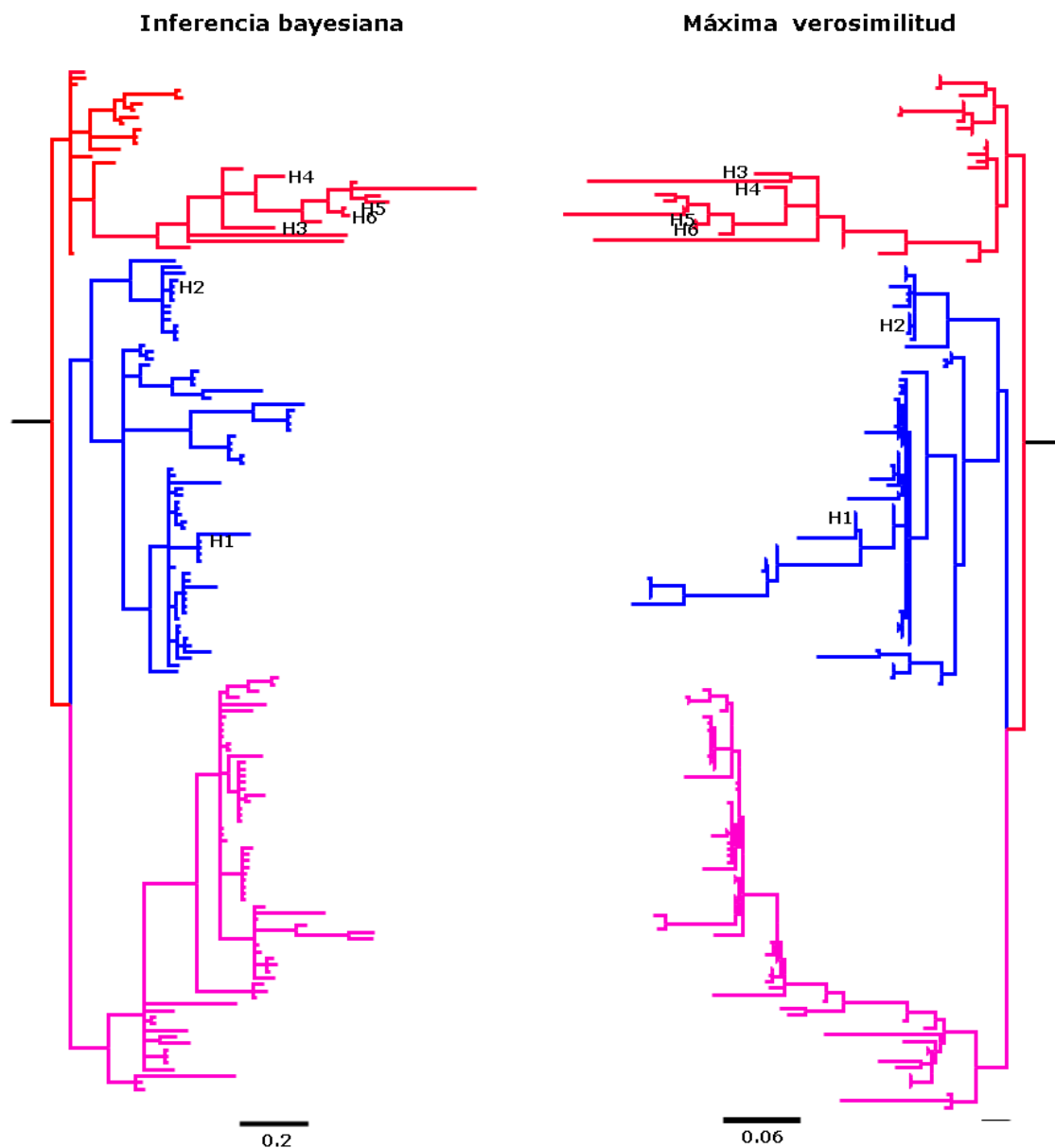


Fig. A17: Comparación de topologías entre el árbol filogenético reconstruido mediante inferencia bayesiana, y aquel reconstruido empleando máxima verosimilitud basándose en el gen *wsp*. Los alelos descritos en *C. parallelus* aparecen nombrados del H1 al H6. El código de colores codifica al supergrupo A (rosa), B (azul), D (verde), F (rojo) y H (morado).



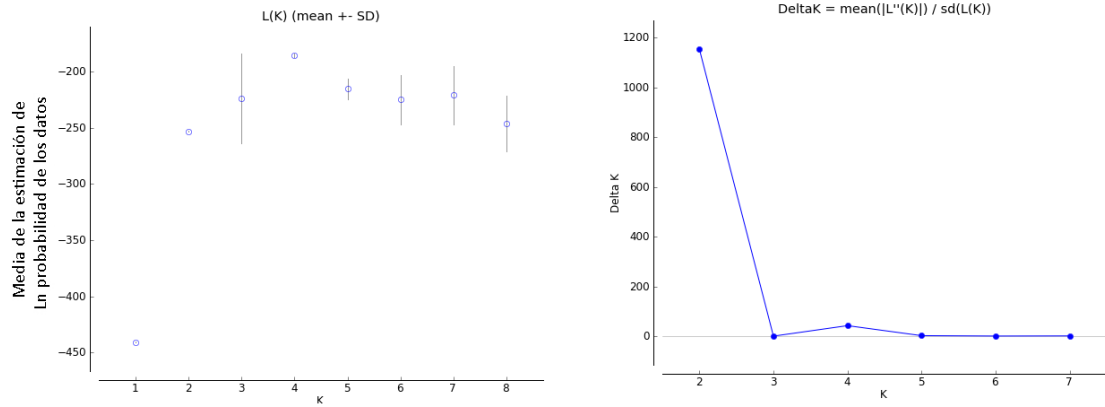


Fig. A18: Estima de la estructura poblacional en el supergrupo F, basándonos en el archivo alélico de cada individuo a) Probabilidades posteriores para cada valor de K. B) Método de Evanno *et al.* (2005) para la estimación del K óptimo, siendo este K=2.

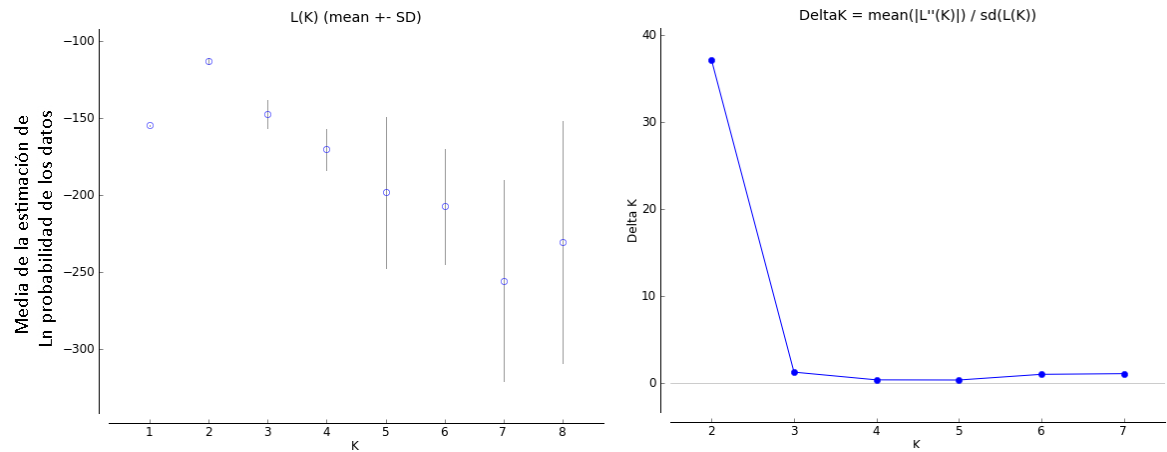


Fig. A19: Estima de la estructura poblacional en el supergrupo B, basándonos en el archivo alélico de cada individuo a) Probabilidades posteriores para cada valor de K. B) Método de Evanno *et al.* (2005) para la estimación del k óptimo, siendo este K=2.

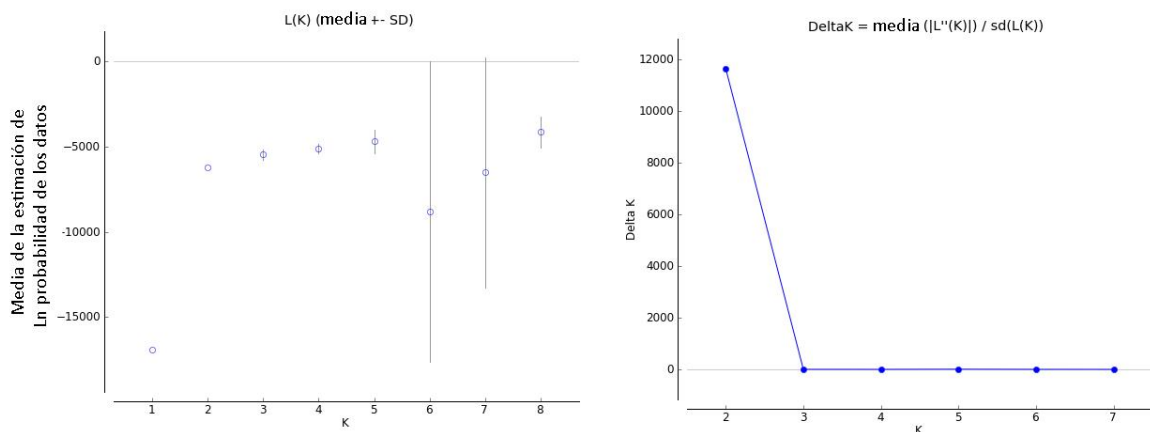


Fig. A20: a) Probabilidades posteriores para cada valor de K. B) Método de (Evanno *et al.*, 2005) para la estimación del K óptimo, siendo este K=2.

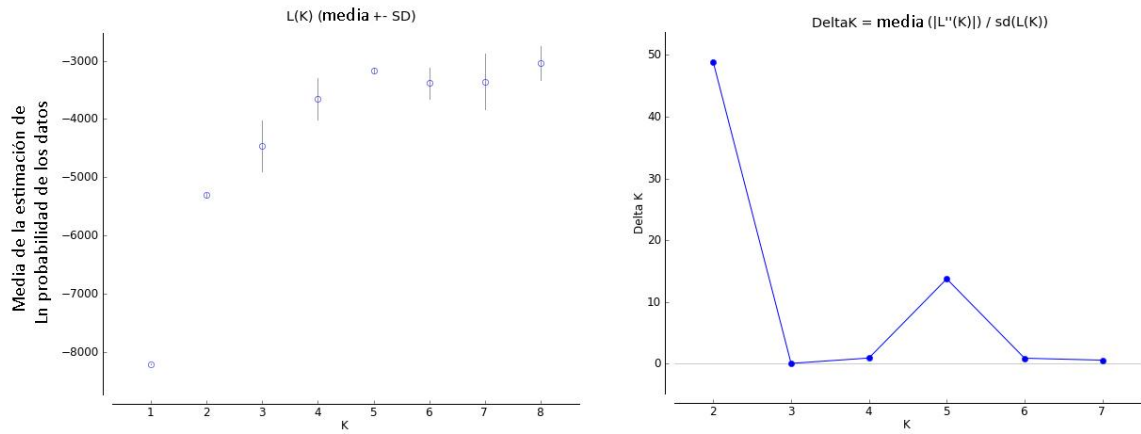


Fig. A21: a) Probabilidades posteriores para cada valor de  $K$ . b) Estimación del  $k$  óptimo ( $=2$ ) según la metodología propuesta por Evanno *et al.* (2005), con un pico secundario en  $K=5$  menos plausible.

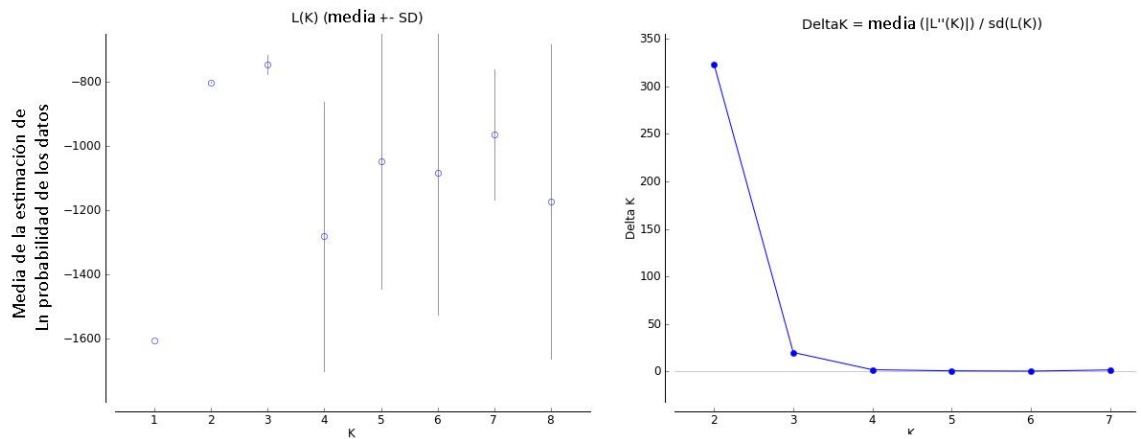


Fig. A22: a) Probabilidades posteriores para cada valor de  $K$ . b) Estimación del  $K$  óptimo según la metodología propuesta por Evanno *et al.* (2005), que resulta ser  $K=2$ .

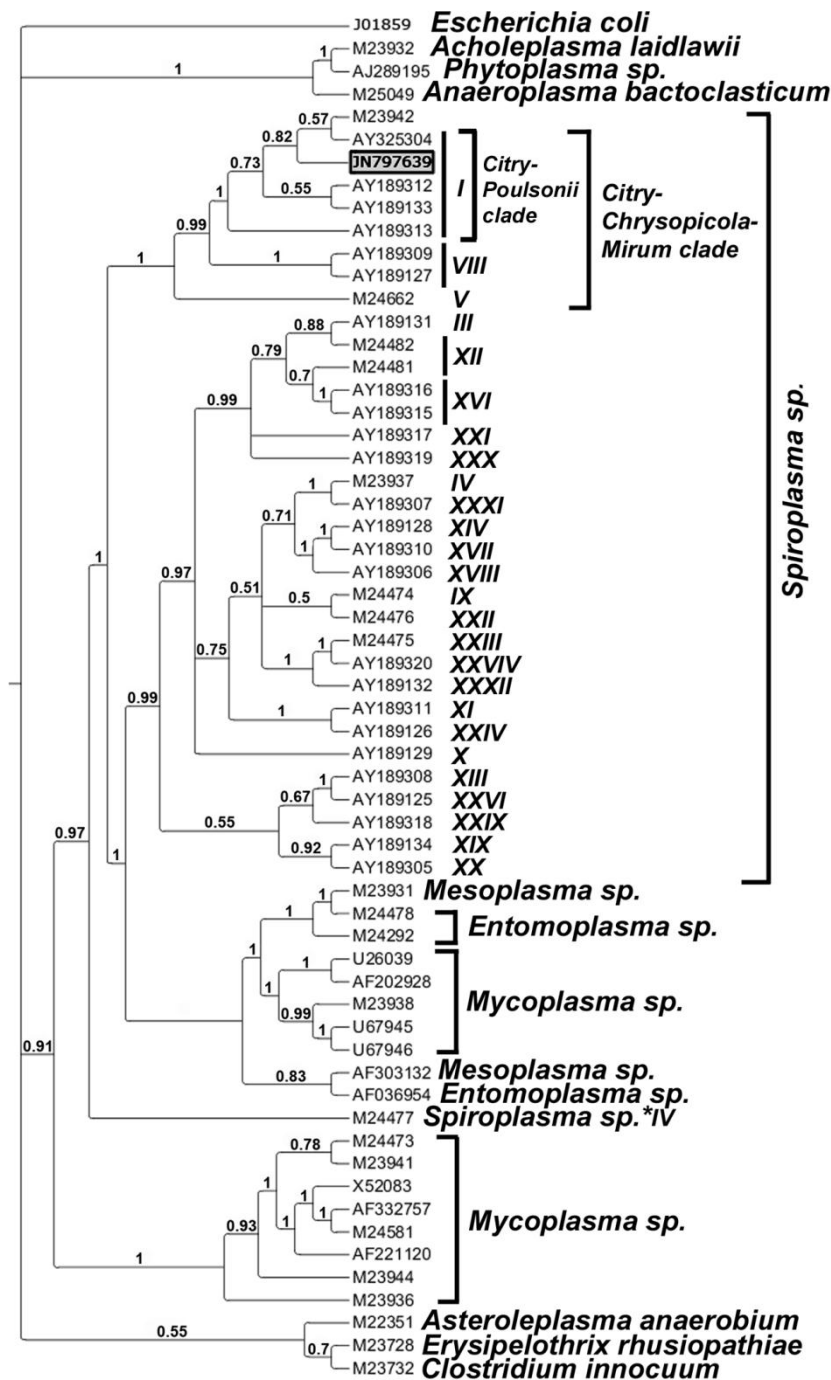


Fig. A23: Dendrograma enraizado obtenido mediante inferencia bayesiada del gen 16S *rRNA* del clado *Spiroplasma*–*Entomoplasmataceae*–*Mycoides*. Nótese que *Spiroplasma* aparece como clado parafilético\*. Sin embargo, la monofilia del clado *Citri*–*Chrysopicola*–*Mirum* (que contiene a los serogrupos I, II, V y VIII) y dentro del cual se adscribe la cepa bacteriana de *Spiroplasma* detectada en *C. parallelus*, está altamente soportada. En particular la cepa se adscribe al clado *Citri*–*Poulsonii*. La designación de los grupos (I–XXXII) sigue la nomenclatura propuesta en Gasparich *et al.* (2004).

## ANEXO B: TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla B1: Poblaciones analizadas en este trabajo, incluidas sus coordenadas geográficas y altitud del punto de muestreo.

Población	Nombre de la población	Latitud	Longitud	Latitud (decimal)	Longitud (decimal)	Altitud
<b>Pirineos</b>						
<b>Zona Híbrida</b>						
1	Arudy (Midi-Pyrénées, Francia)	43°06'01"N	0°26'38"O	43,100278	-0,443889	411m
2	Gabas (Midi-Pyrénées, Francia)	42° 53' 60"N	0° 25' 60 O	42,90000	-0,433333	1020m
3	L'Hermine (Midi-Pyrénées, Francia)	42°51'46,8"N	0°23'30,4"O	42,863000	-0,391778	1209m
4	Soques (Midi-Pyrénées, Francia)	42°20'08"N	0°23'52"O	42,335556	-0,397778	1396m
5	Cabaña Tourmont (Midi-Pyrénées, Francia)	42°49'11"N	0°24'21"O	42,819722	-0,405833	1625m
6	Cabaña Antigua (Midi-Pyrénées, Francia)	42°48'15" N	0°25'4"O	42,804167	-0,417778	1738m
7	Portalet (Huesca, España)	42°48'03"N	0°24'54"O	42,800833	-0,415000	1780m
8	Corral de Mulas (Huesca, España)	42°47'09,4N	0°23'34,4"O	42,785944	-0,392889	1569m
9	Sallent de Gállego (Huesca, España)	42°45'57,5N	0°20'33,9"O	42,765972	-0,342750	1343m
10	Escarrilla (Huesca, España)	42°43'54,1"N	0°18'39,3"O	42,731694	-0,310917	1130m
11	Biescas (Huesca, España)	42°36'28"N	0°19'38"O	42,607778	-0,327222	838m
12	Sabiñánigo (Huesca, España)	42°31'07"N	0°20'52"O	42,518611	-0,347778	769m
<b>Otras poblaciones pirenaicas</b>						
13	Puerto del Cantó (Lleida, España)	42°22'12,90"N	1°14'11,7"E	42,370250	1,236583	1725m
14	Vielha (Lleida, España)	42°40'25,3"N	0°46'26,5" E	42,673694	0,774028	1393m
15	Muna (Francia)	42°53'53"N	0°37'48,8"E	42,898056	0,630222	544m
16	Ibón de Respomuso (Huesca, España)	42°49'00,3 "N	0°17'40,85 "	42,816433	-0,295569	2134m
17	Ibón de Arriel bajo (Huesca, España)	42°49'41,3"N	0° 19'17,63"	42,827835	-0,321731	2185m
<b>Península Ibérica (Centro)</b>						
18	Navafria (Madrid, España)	40°59'01"N	3°49'00"O	40,983875	-3,816917	1780m
19	El Espinar (Segovia, España)	40°44'54"N	4°09'01"O	40,748333	-4,150306	1285m
20	Valsain (Segovia, España)	40° 52' 24"N	4° 1' 39"O	40,873594	-4,027519	1185m
21	Puerto de Morcuera (Madrid, España)	40°49'40"N	3°49'48"O	40,827778	-3,830000	1754m
22	Puerto de Canencia (Madrid, España)	40° 52' 5"N	3° 45' 47"O	40,868325	-3,763204	1512m
23	Puerto de Somosierra (Madrid, España)	41° 7' 30"N	3° 34' 51"O	41,125247	-3,581017	1410m
24	Plataforma de Gredos (Ávila, España)	40° 18' 1"N	5° 12' 51"O	40,300345	-5,214429	1492m
25	Hoyos del Espino (Ávila, España)	40° 20' 21"N	5° 10' 21"O	40,339234	-5,172565	1395m
26	Puerto del Pico (Ávila, España)	40° 23' 48"N	3° 42' 48"O	40,396764	-3,713379	1352m

Población	Nombre de la población	Latitud	Longitud	Latitud (decimal)	Longitud (decimal)	Altitud
27	Becedas (Ávila, España)	40°24' 18"N	5°38' 17"O	40,405000	-5,638111	1091m
28	Orea (Guadalajara, España)	40°32'45"N	1°43'36"O	40,545833	-1,726667	1562m
29	Orihuela (Guadalajara, España)	40° 31' 14"N	1° 39' 51"O	40,520556	-1,664167	1639m
<b>Península Ibérica (Sur)</b>						
30	Bubión (Granada, España)	36°57'1"N	3°21'22"O	36,950500	-3,356333	1332m
31	Capileira (Granada, España)	36° 57' 28 " N	3° 21' 9" O	36,957934	-3,352740	1548m
<b>Península Ibérica (Norte)</b>						
32	Ortigueira-La Magdalena (La Coruña, España)	43° 38' 26"N	7° 48' 58"O	43,640667	-7,816250	194m
33	Mañón-Feira (La Coruña, España)	43° 38' 36"N	7° 44' 03"O	43,643361	-7,734167	402 m
34	Pousadoiro (La Coruña, España)	43° 43' 17"N	7° 52' 57"O	43,721528	-7,882750	81 m
35	Taramundi (Asturias, España)	43°20'55"N	7° 5'5"O	43,348711	-7,084769	208
36	Taramundi II (Asturias, España)	43°21'46"	7°06'20"	43,363011	-7,105808	354m
37	Lugo (Lugo, España)	43° 21' 03"N	7° 7' 58"O	43.351084	-7.133378	231m
38	Busmayor (León, España)	42° 37' 31"N	7°1'18"O	42,625402	-7,021809	1113m
39	Urkaregui (Guipúzcoa, España)	43°13'59"N	2°29'22"O	43,233083	-2,489528	211m
40	Txabarri (Vizcaya, España)	43°13'57"N	3°05'35"O	43,232500	3,093111	253m
41	Álava I (Álava, España)	43°00'23"N	2°44'41"O	43,006389	-2,744722	712m
42	Álava II (Álava, España)	42°58'41"N	2°44'19"O	42,978167	-2,738806	625m
43	Arraitz (Navarra, España)	43°01'38" N	1°38'05"O	43,027222	-1,634722	752m
44	Tudanca (Cantabria, España)	43° 9' 44"N	4° 22' 1"O	43,162462	-4,367183	383m
45	Cervera (Palencia, España)	42° 52'11"N	4° 29'54" O	42,869722	-4,498333	1001m
46	Piedras Luengas (Palencia, España)	43° 2'29" N	4° 27'29" O	43,041389	-4,458056	1349
47	Balboa (León, España)	42° 42' 19"N	6° 55' 32"O	42,705414	-6,925571	692m
<b>Otras</b>						
48	Rada Azul. S. Cruz de Tenerife (Tenerife, España)	28° 24' 31"N	16° 18' 35"O	28,408650	-16,30981	72m
<b>Europa</b>						
<b>Alpes (Francia e Italia)</b>						
49	Col de L'Arche (PACA, France)	44° 25'34" N	6° 53'21" E	44,426194	6,889333	1942m
50	L'Argentera (Cuneo, Italia)	44° 23' 11 " N	6° 57' 53"E	44,386600	6,964883	1637m
51	Valdieri-Puente (Cuneo, Italia)	44° 12' 19"N	7° 22' 47"E	44,205483	7,379933	983m
52	Valdieri-Centro (Cuneo, Italia)	44° 14'59" N	7° 23' 3" E	44,249806	7,384222	877m
<b>UK</b>						
53	Epping Forest (Greater London, England)	51°39'36"N	0°03'00"E	51,66000	0,05000	102m
54	Red Hill Nature Reserve (Lincolnshire, England)	53°18'28"N	00°06'11"O	53,307778	-0,103056	128m
55	Epping Forest II (Greater London, England)	51°40'36"N	00°04'27"O	51,676667	-0,074167	35m
56	Belas Knap (Gloucestershire, England)	51°55'57"N	01°58'21"O	51,932500	-1,972500	251m

Población	Nombre de la población	Latitud	Longitud	Latitud (decimal)	Longitud (decimal)	Altitud
57	Rievaulx (North Yorkshire, England)	54°15'34"N	01°06'45"O	54,259444	-1,112500	151m
58	Mount Caburn (East Sussex, England)	50°51'46"N	00°03'59"O	50,862778	-0,066389	96m
59	Longstone Edge (Derbyshire, England)	53°15'18"N	01°41'30"O	53,255000	-1,691667	360m
60	Cerne Abbas (Dorset, England)	50°49'26"N	02°28'14"O	50,823889	-2,470556	206m
<b>Alemania</b>						
61	Thuringia (Jena, Alemania)	50°52'00"N	11°34'00"E	50,866667	11,566667	220m
62	Saxonia (Gutenfürst, Alemania)	50°25'00"N	11°57'00"E	50,416667	11,950000	582m
<b>Países Nórdicos</b>						
63	Rogaland (Ardal, Noruega)	59° 8' 44"N	E6° 10' 58"E	59,145569	6,182899	9m
64	Telemark (Kviteseid, Noruega)	59° 25' 58"N	E8° 22' 25" E	59,432856	8,373642	548m
65	Jyväskylä (Jyväskylä, Finlandia)	62° 14 ' 49"N	25° 47' 12 "E	62,246947	25,786843	116m
<b>Eslovenia</b>						
66	Mokronog (Trebnje, Eslovenia)	45° 56' 37"N	15° 8' 55"E	45,94366	15,14873	242m

Tabla B2: Significado de los distintos parámetros estimados. Se recomienda consultar las fuentes originales, así como el manual del software *DnaSP Version 5* (<http://www.ub.edu/dnasp/DnaSPHelp.pdf>) y las notas de Holsinger (2012).

Parámetro estimado:	Significado
P	Número de posiciones utilizadas en el análisis
S	Número de posiciones polimórficas
Eta ( $\eta$ )	Número total de mutaciones
K	Número medio de diferencias nucleotídicas (Tajima, 1983).
Hap	Número de haplotipos
Hd	Diversidad haplotípica y su varianza (Nei, 1987).
VarHd	Varianza de la diversidad haplotípica
Pi ( $\pi$ )	Pi ( $\pi$ ), Promedio de las diferencias nucleotídicas entre dos secuencias elegidas al azar de una población (Nei, 1987; Nei & Miller, 1990).
Theta (por sitio)	Theta (por sitio) a partir de Eta ( $\eta$ ) (Nei, 1987). Theta ( $\theta$ ) = $4N\mu$ para un gen autosómico en un organismo diploide, donde N y $\mu$ son el tamaño efectivo de la población y la tasa de mutación por nucleótido por generación, respectivamente.
Theta (por gen)	Theta (por gen) a partir de S (estimador de Watterson). Theta ( $\theta$ ) = $4Nu$ para un gen autosómico en un organismo diploide, donde N y $\mu$ son el tamaño efectivo de la población y la tasa de mutación por gen por generación, respectivamente (Watterson, 1975; Nei, 1987).
TajimaD	Test D propuesto por Tajima (1989), para comprobar la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras (Kimura, 1983). El test D se basa en las diferencias entre el número de sitios segregantes, y el número medio de diferencias nucleotídicas. Valores negativos indican un exceso de polimorfismos en baja frecuencia en relación a lo esperado, lo que puede indicar una expansión poblacional (después de un cuello de botella, o un <i>sweep</i> selectivo), y/o selección purificadora. Un valor positivo indicaría bajos niveles de polimorfismos en alta y baja frecuencia, lo que nos indicaría una reducción en el tamaño poblacional y/o selección balanceadora. Los valores D=0 nos indican que no han existido cambios en el tamaño efectivo de la población y/o no existe selección.
FuLiD*	Test propuesto por Fu and Li (1993) para evaluar la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras (Kimura, 1983). La idea es calcular la probabilidad de observar una muestra aleatoria cuyo número de alelos es igual o inferior al valor esperado para un determinado valor de diversidad y alelos selectivamente neutros. Este test se basa en las predicciones sobre el número de mutaciones esperadas en las ramas externas e internas de una genealogía neutra, en este caso se ha aplicado sin <i>outgroup</i> , por lo que se basa en las diferencias entre $\eta_s$ , el número de <i>singletons</i> (mutaciones que aparecen una única vez en el conjunto de las secuencias) y $\eta$ , el número total de mutaciones. Un valor negativo de F evidencia un exceso de alelos, lo que podría interpretarse como una expansión poblacional. Un valor positivo

	evidencia un déficit de alelos, lo que podría esperarse tras un cuello de botella o selección balanceadora. En principio este test sería más eficiente que el test D de Tajima para detectar expansiones poblacionales.
FuLiF*	Al igual que en el caso anterior, el test propuesto por Fu and Li (1993) evalúa la hipótesis de que todas las mutaciones sean selectivamente neutras (Kimura, 1983). En este caso, el test F* se basa en las diferencias entre $\eta_s$ , el número de <i>singletons</i> (mutaciones que aparecen una única vez en el conjunto de las secuencias) and k, el número medio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (Simonsen <i>et al.</i> , 1995). Un valor negativo de F evidencia un exceso de alelos, lo que podría interpretarse como una expansión poblacional. Un valor positivo evidencia un déficit de alelos, lo que podría esperarse tras un cuello de botella o selección balanceadora.
FuFs	El estadístico Fs (Fu, 1997) se basa en la distribución de la frecuencia haplotípica, condicionada por el valor de $\theta$ (Ewens, 1972). Este test es similar al propuesto por Tajima, y su interpretación es similar, pero está diseñado para detectar las desviaciones de la neutralidad reflejadas en las diferencias entre alelos muy frecuentes, y medianamente frecuentes. El test de Tajima, es sensible a las diferencias en los alelos poco frecuentes. La combinación de ambos test permiten distinguir entre una expansión poblacional (detectada solo por D), y selección purificadora.
G+C	Contenido en pares de bases G+C en la región analizada.
Ka/Ks	Ratio entre el número de sustituciones no sinónimos por no sitio no sinónimo (Ka) y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (Ks). $Ka/Ks \ll 1$ sería indicativo de selección purificadora, mientras que $Ka/Ks \gg 1$ sería indicativo de selección positiva (Hurst, 2002).



Tabla B3: Frecuencias de infección por los distintos supergrupos de *Wolbachia* ( $\pm 2$  veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (1927) en la población pirenaica de *C. parallelus* de Sallent de Gállego (zona híbrida).

Sexo	Infección		Julio		Agosto		Septiembre	
	Clase	Supergrupo	Frecuencias	n	Frecuencias	n	Frecuencias	n
Datos globales	Infectado	B	0,34 $\pm$ 0,10	92	0,23 $\pm$ 0,08	122	0,15 $\pm$ 0,06	107
		F	0,99 $\pm$ 0,02		0,01 $\pm$ 0,02		0,02 $\pm$ 0,02	
		BF	0,63 $\pm$ 0,10		0,75 $\pm$ 0,08		0,82 $\pm$ 0,07	
	No infectado	O	0,01 $\pm$ 0,02		0,01 $\pm$ 0,02		0,01 $\pm$ 0,01	
Machos	Infectado	B	0,45 $\pm$ 0,14	47	0,23 $\pm$ 0,11	57	0,20 $\pm$ 0,11	49
		F	0,98 $\pm$ 0,04		1,00 $\pm$ 0,00		0,98 $\pm$ 0,02	
		BF	0,53 $\pm$ 0,14		0,75 $\pm$ 0,11		0,75 $\pm$ 0,12	
	No infectado	O	0,02 $\pm$ 0,04		0,00 $\pm$ 0,00		0,02 $\pm$ 0,02	
Hembras	Infectado	B	0,22 $\pm$ 0,12	45	0,23 $\pm$ 0,11	65	0,10 $\pm$ 0,08	58
		F	1,00 $\pm$ 0,00		0,99 $\pm$ 0,03		1,00 $\pm$ 0,00	
		BF	0,73 $\pm$ 0,13		0,75 $\pm$ 0,11		0,90 $\pm$ 0,08	
	No infectado	O	0,00 $\pm$ 0,00		0,01 $\pm$ 0,03		0,00 $\pm$ 0,00	

Tabla B4: Frecuencias de infección por los distintos supergrupos de *Wolbachia* ( $\pm 2$  veces la desviación estándar tras la corrección de Wilson (1927) en la población pirenaica de *C. parallelus* de Sallent de Gállego (zona híbrida). Los asteriscos muestran las diferencias significativas para  $p\text{-valor} > 0,01$ .

Sexo	Infección		Julio		Agosto		Septiembre	
	Clase	Supergrupo	Frecuencias	n	Frecuencias	n	Frecuencias	n
Datos globales	Infectado	B						
		F	1.00 $\pm$ 0.00*	0.57 $\pm$ 0.1	0.98 $\pm$ 0.03*	0.68 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.06*	0.68 $\pm$ 0.10
		BF		0.40 $\pm$ 0.14*		0.19 $\pm$ 0.08*		0.10 $\pm$ 0.06*
	No infectado	O	0.00 $\pm$ 0.00*	0.00 $\pm$ 0.00*	0.02 $\pm$ 0.03*	0.02 $\pm$ 0.03*	0.09 $\pm$ 0.06*	0.09 $\pm$ 0.06*
Machos	Infectado	B		0.02 $\pm$ 0.04		0.08 $\pm$ 0.08		0.07 $\pm$ 0.08
		F	1.00 $\pm$ 0.00*	0.58 $\pm$ 0.14*	0.98 $\pm$ 0.04*	0.79 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.11*	0.73 $\pm$ 0.15*
		BF		0.4 $\pm$ 0.14*		0.11 $\pm$ 0.09		0.05 $\pm$ 0.07*
	No infectado	O	0.00 $\pm$ 0.00*	0.00 $\pm$ 0.00*	0.02 $\pm$ 0.04*	0.02 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.11*	0.15 $\pm$ 0.11*
Hembras	Infectado	B		0.10 $\pm$ 0.09		0.14 $\pm$ 0.08		0.17 $\pm$ 0.11
		F	1.00 $\pm$ 0.00	0.56 $\pm$ 0.14	0.98 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.14	0.96 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.14
		BF		0.33 $\pm$ 0.13		0.26 $\pm$ 0.12		0.15 $\pm$ 0.11
	No infectado	O	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.04	0.04 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.06

Tabla B5: Diversidad genética de los distintos *loci* analizados. P= Posiciones analizadas, S=número total de posiciones polimórficas, Eta=número total de mutaciones, K=Número medio de diferencias nucleotídicas, Hap=número total de haplotipos, Hd=Diversidad haplotípica, VarHd, varianza de la diversidad haplotípica, Pi=Diversidad nucleotídica, Theta (por sitio) o estimador del polimorfismo de acuerdo al neutralismo según (Nei, 1987), Theta (por gen) o estimador del polimorfismo de acuerdo al neutralismo según (Watterson, 1975a), TajimaD =test de Tajima de neutralismo (Tajima, 1989b) y su significación: \*\* 0.1, \*\*\*0.01, FuLiD\*= Test de neutralismo de Fu and Li's D\* (Fu & Li, 1993a) y significación, FuLiF\*=Test de neutralismo de Fu and Li's F\*(Fu & Li, 1993a) y significación, FuFs =Test de neutralismo de Fu's Fs (Fu, 1997a). G+C= contenido en G+C, R=Detección de recombinación.

Gen	P	S	Eta	Hap	Hd	VarHd	Pi	Theta (por sitio)	Theta (por gen)	K	TajimaD	FuLiD*	FuLiF*	FuFs	G+C	Ka/Ks	R (MaxChi, P < 0.01)
<i>gatB</i>	370	39	39	5	0,7	0,0004	0,0469	0,0199	7,346	17,298	4,165***	2,092**	3,517**	37,114	0,370	0,081	NO
<i>coxA</i>	402	41	42	6	0,8	0,0002	0,0404	0,0198	7,951	16,251	3,238**	2,122**	3,090**	31,872	0,385	0,064	NO
<i>hcpA</i>	419	57	57	10	0,9	0,0002	0,0565	0,0256	10,719	23,662	3,818***	2,057**	3,351**	33,957	0,366	0,109	NO
<i>ftsZ</i>	435	59	59	5	0,7	0,0002	0,0639	0,0256	11,151	27,801	4,740***	2,274**	3,965**	54,009	0,407	0,037	SI:1(34)
<i>fbpA</i>	429	61	62	5	0,8	0,0001	0,0677	0,0275	11,621	28,579	4,625***	2,307**	3,943**	56,249	0,394	0,077	SI: 3(83)

Tabla B6: Diversidad genética del los distintos *loci* analizados. n= número de secuencias analizadas, P= Posiciones analizadas, S=número total de posiciones polimórficas, Eta= número total de mutaciones, K= Número medio de diferencias nucleotídicas, Hap= número total de haplotipos, Hd= Diversidad haplotípica, VarHd= varianza de la diversidad haplotípica, Pi= Diversidad nucleotídica, Theta (por sitio), o estimador del polimorfismo de acuerdo al neutralismo según (Nei, 1987), Theta (por gen), o estimador del polimorfismo de acuerdo al neutralismo según (Watterson, 1975a), TajimaD= test de Tajima de neutralismo (Tajima, 1989b) y su significación: \*\* 0.1, \*\*\*0.01, FuLiD\*= Test de neutralismo de Fu and Li's D\* (Fu & Li, 1993a) y significación, FuLiF\*= Test de neutralismo de Fu and Li's F\*(Fu & Li, 1993a) y significación, FuFs = Test de neutralismo de Fu's Fs (Fu, 1997a). G+C= contenido en G+C. n.d.= "no determinado".

Gen	supergrupo	P	S	Eta	Hap	Hd	VarHd	Pi	Theta (por sitio)	Theta (por gen)	k	Tajima D	FuLiD*	FuLiF*	FuFs	G+C
<i>coxA</i>	F	438	3	3	2	1	0,250	0,007	0,007	3,00	3,00	n.d.	n.d.	n.d.	1,099	0,391
	B	438	17	17	4	1	0,031	0,022	0,023	9,27	8,83	-0,484	-0,5	0	0,381	0,381
<i>fbpA</i>	F	429	10	10	3	1	0,074	0,016	0,016	6,66	6,66	n.d.	n.d.	n.d.	0,703	0,396
	B	429	1	1	2	1	0,250	0,002	0,002	1,00	1,00	n.d.	n.d.	n.d.	0,000	0,396
<i>hcpA</i>	F	419	15	15	5	1	0,016	0,018	0,017	7,20	7,60	0,406	0,406	0,433	-0,710	0,371
	B	419	11	11	5	1	0,016	0,014	0,013	5,28	5,80	0,709	0,709	0,750	-1,113	0,359
<i>gatB</i>	F	369	3	3	2	1	0,250	0,008	0,008	3,00	3,00	n.d.	n.d.	n.d.	1,099	0,373
	B	369	2	2	3	1	0,074	0,004	0,004	1,33	1,33	n.d.	n.d.	n.d.	-1,216	0,364
<i>ftsZ</i>	F	435	3	3	2	1	0,250	0,007	0,007	3,00	3,00	n.d.	n.d.	n.d.	1,099	0,410
	B	435	3	3	2	1	0,074	0,005	0,005	2,00	2,00	n.d.	n.d.	n.d.	-0,693	0,404

Tabla B7: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los distintos alelos detectados para el gen *coxA* de *Wolbachia* que infecta a *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula de la desviación típica de una proporción propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

Alelo x	Alelo y	Ks	±SD	Años de divergencia	± años
H1	H2	0,365	0,053	405.889	58.726
H1	H3	0,363	0,053	403.778	58.544
H1	H4	0,037	0,021	41.111	23.021
H1	H5	0,365	0,053	405.889	58.726
H1	H6	0,346	0,052	384.333	58.012
H2	H3	0,190	0,043	211.333	47.770
H2	H4	0,385	0,053	427.889	59.348
H2	H5	0,012	0,012	13.444	13.334
H2	H6	0,012	0,012	13.444	13.334
H3	H4	0,383	0,053	425.667	59.173
H3	H5	0,175	0,042	194.333	46.239
H3	H6	0,175	0,042	194.333	46.239
H4	H5	0,385	0,053	427.889	59.348
H4	H6	0,365	0,053	405.889	58.726
H5	H6	0,025	0,017	27.222	18.855

Tabla B8: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los distintos alelos detectados para el gen fbpA de *Wolbachia* que infecta a *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula de la desviación típica de una proporción propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

Alelo x	Alelo y	ks	±SD	Años de divergencia	± años
H1	H2	0,659	0,047	731.778	51.997
H1	H2	0,040	0,019	44.444	21.480
H1	H3	0,681	0,046	756.222	51.087
H1	H5	0,030	0,017	33.111	18.631
H2	H2	0,661	0,047	734.556	51.968
H2	H3	0,010	0,010	10.889	10.811
H2	H5	0,660	0,047	733.667	51.977
H2	H3	0,683	0,046	759.222	51.034
H2	H5	0,072	0,025	79.444	28.266
H3	H5	0,682	0,046	758.222	51.050

Tabla B9: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los distintos alelos detectados para el gen *ftsZ* de *Wolbachia* que infecta a *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula de la desviación típica de una proporción propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

alelo x	alelo y	Ks	±SD	Años de divergencia	±años
H1	H2	0,765	0,042	850.222	46.594
H1	H3	0,020	0,014	21.889	15.239
H1	H4	0,010	0,010	10.889	10.794
H1	H5	0,739	0,043	820.556	48.307
H2	H3	0,767	0,042	852.556	46.488
H2	H4	0,739	0,043	820.556	48.307
H2	H5	0,030	0,017	33.556	18.874
H3	H4	0,030	0,017	33.111	18.646
H3	H5	0,741	0,043	822.778	48.227
H4	H5	0,713	0,045	791.889	49.741

Tabla B10: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los distintos alelos detectados para el gen *hcpA* de la cepa de *Wolbachia* que infecta a *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

alelo x	alelo y	Ks	±SD	Años de divergencia	±Años
H1	H2	0,454	0,051	504.889	56.222
H1	H3	0,021	0,015	23.222	16.124
H1	H4	0,454	0,051	504.889	56.222
H1	H5	0,443	0,050	492.111	55.990
H1	H6	0,065	0,025	71.778	27.732
H1	H7	0,387	0,049	430.444	54.818
H1	H8	0,042	0,020	47.000	22.687
H1	H9	0,111	0,032	122.778	35.309
H1	H10	0,388	0,049	431.444	54.889
H2	H3	0,494	0,051	549.333	56.501
H2	H4	0,000	0,000	0	0
H2	H5	0,000	0,000	0	0
H2	H6	0,506	0,051	561.889	56.550
H2	H7	0,032	0,018	35.111	19.735
H2	H8	0,494	0,051	549.333	56.501
H2	H9	0,464	0,051	515.444	56.310
H2	H10	0,032	0,018	35.111	19.753
H3	H4	0,494	0,051	549.333	56.501
H3	H5	0,482	0,051	535.778	56.372
H3	H6	0,065	0,025	71.889	27.777
H3	H7	0,424	0,050	470.667	55.651
H3	H8	0,042	0,020	47.111	22.732
H3	H9	0,087	0,029	96.889	31.801



alelo x	alelo y	Ks	±SD	Años de divergencia	±Años
H3	H10	0,425	0,050	471.778	55.714
H4	H5	0,000	0,000	0	0
H4	H6	0,506	0,051	561.889	56.550
H4	H7	0,032	0,018	35.111	19.735
H4	H8	0,494	0,051	549.333	56.501
H4	H9	0,464	0,051	515.444	56.310
H4	H10	0,032	0,018	35.111	19.753
H5	H6	0,493	0,051	548.000	56.452
H5	H7	0,032	0,018	35.000	19.672
H5	H8	0,482	0,051	535.778	56.372
H5	H9	0,452	0,050	502.444	56.101
H5	H10	0,032	0,018	35.000	19.688
H6	H7	0,434	0,050	481.889	55.861
H6	H8	0,021	0,015	23.222	16.152
H6	H9	0,042	0,020	47.111	22.732
H6	H10	0,435	0,050	483.000	55.925
H7	H8	0,424	0,050	470.667	55.651
H7	H9	0,396	0,050	440.111	55.035
H7	H10	0,000	0,000	0	0
H8	H9	0,064	0,025	71.556	27.668
H8	H10	0,425	0,050	471.778	55.714
H9	H10	0,397	0,050	441.000	55.102

Tabla B11: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los distintos alelos detectados para el gen *hcpA* de *Wolbachia* que infecta a *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula de la desviación típica de una proporción propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

Alelo x	Alelo y	Ks	±SD	Años de divergencia	±Años
H1	H2	0,455	0,056	505.556	62.382
H1	H3	0,013	0,013	14.222	14.097
H1	H4	0,506	0,056	562.444	62.767
H1	H5	0,000	0,000	0	0
H2	H3	0,432	0,056	480.000	62.054
H2	H4	0,026	0,018	28.778	19.919
H2	H5	0,455	0,056	505.556	62.382
H3	H4	0,482	0,056	535.000	62.729
H3	H5	0,013	0,013	14.222	14.097
H4	H5	0,506	0,056	562.444	62.767

Tabla B12: distancias genéticas corregidas mediante los modelos de *JC* y *GTR* entre las distintas cepas de *Wolbachia* analizadas, pertenecientes al supergrupo F.

		JC			
		ST10	ST11	ST24	ST25
GTR	ST10		0,00393	0,01137	0,00789
	ST11	0,00394		0,01336	0,00987
	ST24	0,01140	0,01341		0,00443
	ST25	0,00792	0,00992	0,00443	

Tabla B13: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los principales ST pertenecientes al supergrupo F detectados en ambas subespecies de *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula de la desviación típica de una proporción propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

ST-X	ST-Y	Ks	±SD	Años de divergencia	±Años
ST10	ST11	0,0109	0,005	12.111	5.357
ST10	ST24	0,0376	0,009	41.778	9.820
ST10	ST25	0,0241	0,007	26.778	7.913
ST11	ST24	0,0445	0,010	49.444	10.649
ST11	ST25	0,0308	0,008	34.222	8.919
ST24	ST25	0,0131	0,005	14.556	5.873

Tabla B14: distancias genéticas corregidas mediante los modelos de *JC* y *GTR* entre las distintas cepas analizadas, pertenecientes al supergrupo F.

		JC									
		ST3	ST6	ST7	ST13	ST14	ST16	ST17	ST32	ST33	ST31
GTR	ST3		0,00148	0,00098	0,00197	0,00148	0,00494	0,00098	0,00494	0,00643	0,01441
	ST6	0,00148		0,00246	0,00148	0,00197	0,00643	0,00246	0,00543	0,00692	0,01491
	ST7	0,00099	0,00247		0,00197	0,00148	0,00494	0,00098	0,00593	0,00643	0,01341
	ST13	0,00197	0,00148	0,00197		0,00049	0,00494	0,00197	0,00692	0,00742	0,01541
	ST14	0,00148	0,00197	0,00148	0,00049		0,00444	0,00148	0,00643	0,00692	0,01491
	ST16	0,00494	0,00643	0,00494	0,00495	0,00445		0,00494	0,00197	0,00246	0,01041
	ST17	0,00099	0,00247	0,00099	0,00197	0,00148	0,00494		0,00593	0,00742	0,01441
	ST32	0,00494	0,00544	0,00594	0,00693	0,00643	0,00197	0,00594		0,00148	0,00941
	ST33	0,00643	0,00693	0,00644	0,00743	0,00694	0,00247	0,00743	0,00148		0,00792
	ST31	0,01444	0,01495	0,01344	0,01546	0,01496	0,01043	0,01444	0,00942	0,00793	

Tabla B15: Tasa de divergencia sinónima Ks-JC, entre los principales ST pertenecientes al supergrupo B detectados en ambas subespecies de *C. parallelus*. En gris aparecen señalados los datos a los que se hace referencia en el texto. SD: Desviación típica calculada utilizando la fórmula de la desviación típica de una proporción propuesta por Neter *et al.*, (1978), tal como proponen Raychoudhury *et al.* (2009).

ST-X	ST-Y	Ks	±SD	Años de divergencia	±Años
ST13	ST31	0,014	0,006	15.667	6.332
ST6	ST31	0,012	0,005	13.111	5.799
ST13	ST33	0,012	0,005	13.111	5.805
ST14	ST31	0,012	0,005	13.111	5.799
ST17	ST31	0,012	0,005	13.111	5.797
ST3	ST31	0,009	0,005	10.444	5.182
ST6	ST33	0,009	0,005	10.444	5.188
ST7	ST31	0,009	0,005	10.444	5.180
ST14	ST33	0,009	0,005	10.444	5.188
ST16	ST31	0,009	0,005	10.444	5.180
ST17	ST33	0,009	0,005	10.444	5.186
ST3	ST33	0,007	0,004	7.889	4.514
ST7	ST33	0,007	0,004	7.889	4.512
ST13	ST32	0,007	0,004	7.889	4.513
ST16	ST33	0,007	0,004	7.889	4.512
ST6	ST16	0,007	0,004	7.778	4.479
ST32	ST31	0,007	0,004	7.778	4.477
ST3	ST13	0,005	0,003	5.222	3.676
ST3	ST16	0,005	0,003	5.222	3.675
ST6	ST14	0,005	0,003	5.222	3.676
ST6	ST17	0,005	0,003	5.222	3.675
ST6	ST32	0,005	0,003	5.222	3.676
ST7	ST13	0,005	0,003	5.222	3.675
ST7	ST16	0,005	0,003	5.222	3.673
ST13	ST16	0,005	0,003	5.222	3.675
ST14	ST32	0,005	0,003	5.222	3.676

ST-X	ST-Y	Ks	±SD	Años de divergencia	±Años
ST17	ST32	0,005	0,003	5.222	3.675
ST32	ST33	0,005	0,003	5.222	3.677
ST3	ST6	0,002	0,002	2.556	2.575
ST3	ST14	0,002	0,002	2.556	2.575
ST3	ST17	0,002	0,002	2.556	2.574
ST3	ST32	0,002	0,002	2.556	2.575
ST6	ST7	0,002	0,002	2.556	2.574
ST6	ST13	0,002	0,002	2.556	2.575
ST7	ST14	0,002	0,002	2.556	2.574
ST7	ST17	0,002	0,002	2.556	2.573
ST7	ST32	0,002	0,002	2.556	2.574
ST13	ST14	0,002	0,002	2.556	2.575
ST13	ST17	0,002	0,002	2.556	2.574
ST14	ST16	0,002	0,002	2.556	2.574
ST16	ST17	0,002	0,002	2.556	2.573
ST16	ST32	0,002	0,002	2.556	2.574
ST33	ST31	0,002	0,002	2.556	2.573
ST3	ST7	0,000	0,000	0	0
ST14	ST17	0,000	0,000	0	0

Tabla B16: Asignación de los distintos HVR para cada uno de los alelos descritos para el gen *wsp* (y su supergrupo). Junto con la asignación de cada HVR se muestra el HVR más próximo descrito en las bases de datos, así como el género del hospedador donde ha sido descrito: O=*Opisthophthalmus*; A=*Apoica*, N=*Nasonia*, T=*Tetranychus*, TB= *Tribolium*, ?= Desconocido.

Alelo	Supergrupo	HVR1	BLAST	Género	HVR2	BLAST	Género	HVR3	BLAST	Género	HVR4	BLAST	Género
1	B	1	18	N	1	18	?	1	3	TB	1	249	?
2	B	1	18	N	2	18	T	2	23	T	2	251	?
3	F	2	64	A	3	64	A	3	71	A	3	73	?
4	F	3	64	A	4	64	A	4	71	A	4	69	A
5	F	4	25	O	5	25	O	5	30	O	5	29	O
6	F	4	25	?	6	25	O	5	30	O	5	29	O

Tabla B17: Resultados de la metodología propuesta por Evanno *et al.*, (2005) para determinar el número de clusters existente dentro del supergrupo F, considerando su archivo alélico. En amarillo el K óptimo detectado, K=2. Los cálculos se estimaron tras 10 repeticiones (Reps). Se calcularon y representaron los valores medios de  $L'(K)$ , su desviación típica (Stdev  $\ln P(K)$ ),  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ .  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  supone el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos;  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observadas en el apartado anterior, e  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ , la variación de K (ver detalles en la sección de material y métodos).

K	Reps	Media $\ln P(K)$	Stdev $\ln P(K)$	$L'(K)$	$ L''(K) $	Delta K
1	10	-440.600000	0.329983	—	—	—
2	10	-253.110000	0.137032	187.490000	158.180000	1154.328647
3	10	-223.800000	39.645821	29.310000	8.880000	0.223983
4	10	-185.610000	1.604473	38.190000	68.030000	42.400217
5	10	-215.450000	9.312507	-29.840000	20.400000	2.190602
6	10	-224.890000	21.907505	-9.440000	13.410000	0.612119
7	10	-220.920000	25.850932	3.970000	29.090000	1.125298
8	10	-246.040000	24.727816	-25.120000	—	—



Tabla B18: Resultados de la metodología propuesta por Evanno *et al.*, (2005) para determinar el número de clusters existente dentro del supergrupo B, considerando su archivo alélico. En amarillo el K óptimo detectado, K=2. Los cálculos se estimaron tras 10 repeticiones (Reps). Se calcularon y representaron los valores medios de  $L'(K)$ , su desviación típica (Stdev  $\ln P(K)$ ),  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ .  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  muestra el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos, siendo  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observada en el apartado anterior, e  $\Delta K = m(|L''(K)|/s[L(K)])$ , la variación de K (ver detalles en el material y métodos).

K	Reps	Media $\ln P(K)$	Stdev $\ln P(K)$	$L'(K)$	$ L''(K) $	Delta K
1	10	-154.920000	0.482586	—	—	—
2	10	-113.240000	2.048956	41.680000	76.170000	37.175023
3	10	-147.730000	9.138691	-34.490000	11.830000	1.294496
4	10	-170.390000	13.381119	-22.660000	5.440000	0.406543
5	10	-198.490000	49.039926	-28.100000	19.090000	0.389275
6	10	-207.500000	37.500133	-9.010000	39.070000	1.041863
7	10	-255.580000	65.141569	-48.080000	72.910000	1.119255
8	10	-230.750000	78.326996	24.830000	—	—

Tabla B19: Resultados de la metodología propuesta por Evanno *et al.*, (2005). En amarillo el K óptimo detectado, K=2. Los cálculos se estimaron tras 10 repeticiones (Reps). Se calcularon y representaron los valores medios de  $L'(K)$ , su desviación típica (Stdev LnP(K)),  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ .  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  es el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos, siendo  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observada en el apartado anterior, e  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ , la variación de K (ver detalles en el material y métodos).

K	Reps	Media LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-16904.60	0.14	—	—	—
2	10	-6222.87	0.86	10681.73	9938.54	11622.46
3	10	-5479.68	323.93	743.19	369.27	1.14
4	10	-5105.76	278.20	373.92	38.15	0.14
5	10	-4693.69	691.93	412.07	4531.13	6.55
6	10	-8812.75	8813.01	-4119.06	6413.70	0.73
7	10	-6518.11	6760.34	2294.64	68.26	0.01
8	10	-4155.21	890.67	2362.90	—	—

Tabla B20: Estima de la estructura poblacional del supergrupo F. Resultados de la metodología propuesta por Evanno *et al.*, (2005). En amarillo el K óptimo detectado, K=2. Los cálculos se estimaron tras 10 repeticiones (Reps). Se calcularon y representaron los valores medios de  $L'(K)$ , su desviación típica (Stdev LnP(K)),  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ .  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  supone el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos, siendo  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$  la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observada en el apartado anterior, e  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ , la variación de K(ver detalles en el material y métodos).

K	Reps	Media LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-8212.08	5.56	—	—	—
2	10	-5307.00	42.17	2905.08	2058.92	48.83
3	10	-4460.84	431.08	846.16	32.34	0.08
4	10	-3647.02	353.32	813.82	332.50	0.94
5	10	-3165.70	50.58	481.32	695.45	13.75
6	10	-3379.82	264.94	-214.13	241.37	0.91
7	10	-3352.58	481.71	27.25	288.66	0.60
8	10	-3036.68	286.46	315.90	—	—

Tabla B21: Estima de la estructura poblacional del supergrupo B. Resultados de la metodología propuesta por Evanno *et al.*, (2005). En amarillo el K óptimo detectado, K=2. Los cálculos se estimaron tras 10 repeticiones (Reps). Se calcularon y representaron los valores medios de  $L'(K)$ , su desviación típica (Stdev LnP(K)),  $L''(K)$ , así como  $\Delta K$ . Siendo  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  el incremento de los valores de  $L(K)$  para dos valores de K consecutivos;  $L''(K) = |L'(K+1) - L'(K)|$ , la diferencia en valor absoluto entre las diferencias en el valor de K observada en el apartado anterior, e  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$ , la variación de K (ver detalles en la sección de material y métodos).

K	Reps	Media LnP(K)	Stdev LnP(K)	$L'(K)$	$ L''(K) $	Delta K
1	10	-1607.82	0.16	—	—	—
2	10	-803.00	2.32	804.82	749.22	323.01
3	10	-747.40	29.56	55.60	591.02	19.99
4	10	-1282.82	420.02	-535.42	769.66	1.83
5	10	-1048.58	398.38	234.24	269.99	0.68
6	10	-1084.34	443.58	-35.76	154.36	0.35
7	10	-965.74	203.84	118.60	328.56	1.61
8	10	-1175.70	489.58	-209.96	—	—

Tabla B22: Resultados del *Exact test of population differentiation* siguiendo la metodología de Rousset *et al.* (1992) implementado en *ARLEQUIN*. En gris se marcan las poblaciones entre las que se observa diferenciación.

	Pto. Cantó	Centro	Escarrilla	Sallent	Alpes	Norte	Vielha	Bubión	Eslovenia	Tourmont	Portalet	C. Mulas	ZH Francia
Pto. Cantó													
Centro	0,00458 ± 0,0008												
Escarrilla	0,10008 ± 0,0021	0,00216 ± 0,0005											
Sallent	0,24378 ± 0,0048	0,00015 ± 0,0001	0,10440 ± 0,0042										
Alpes	0,06187 ± 0,0015	0,00021 ± 0,0001	0,03494 ± 0,0017	0,39706 ± 0,0041									
Norte	0,10136 ± 0,0015	0,00207 ± 0,0004	≈ 0,00000	0,10483 ± 0,0028	0,03525 ± 0,0011								
Vielha	0,01245 ± 0,0010	0,00002 ± 0,0000	0,01049 ± 0,0008	0,00210 ± 0,0006	0,00247 ± 0,0005	0,01230 ± 0,0006							
Bubión	0,05564 ± 0,0030	≈ 0,00000	0,02453 ± 0,0024	0,03982 ± 0,0011	0,00212 ± 0,0004	0,02717 ± 0,0008	0,00013 ± 0,0001						
Eslovenia	0,50524 ± 0,0020	0,15809 ± 0,0027	0,25167 ± 0,0021	0,70584 ± 0,0059	0,27881 ± 0,0042	0,24826 ± 0,0023	≈ 0,00000	0,42498 ± 0,0123					
Tourmont	0,01702 ± 0,0008	0,00038 ± 0,0002	0,01731 ± 0,0006	0,01048 ± 0,0013	0,00451 ± 0,0004	0,01802 ± 0,0009	≈ 0,00000	0,00146 ± 0,0004	≈ 0,00000				
Portalet	0,00802 ± 0,0009	≈ 0,00000	≈ 0,00000	0,00049 ± 0,0003	0,00033 ± 0,0002	≈ 0,00000	0,00052 ± 0,0001	0,00046 ± 0,0003	0,12316 ± 0,0015	0,00135 ± 0,0003			
C. Mulas	0,39703 ± 0,0045	0,03246 ± 0,0018	0,09899 ± 0,0013	0,57693 ± 0,0065	0,14184 ± 0,0023	0,10019 ± 0,0014	0,03558 ± 0,0014	0,37234 ± 0,0104	1,00000 ± 0,0000	0,04496 ± 0,0012	0,02705 ± 0,0015		
ZH Francia	0,49858 ± 0,0032	0,15600 ± 0,0035	0,24915 ± 0,0022	0,70848 ± 0,0057	0,28748 ± 0,0067	0,25371 ± 0,0019	0,14421 ± 0,0017	0,41815 ± 0,0090	1,00000 ± 0,0000	0,16910 ± 0,0021	0,12423 ± 0,0018	1,00000 ± 0,0000	

Tabla B23: Resultados del test de AMOVA *locus by locus* implementado en *ARLEQUIN*.

Locus	Entre grupos				Entre poblaciones dentro de los grupos				Dentro de las poblaciones				Indices de fijación					
	SSD	g.l.	Va(%)	variación	SSD	g.l.	Vb(%)	variación	SSD	g.l.	Vc(%)	variación	F <sub>SC</sub>	P-valor	F <sub>ST</sub>	P-valor	F <sub>CT</sub>	P-valor
<i>gatB</i>	1437156	3	0,28	80,20	116632	9	0,02	5,86	258333	53	0,05	13,95	0,2957	0,0557	0,8605	0,0000	0,8020	0,0029
<i>coxA</i>	1809649	3	0,35	73,60	208533	9	0,04	7,74	465152	53	0,09	18,65	0,2934	0,0059	0,8135	0,0000	0,7360	0,0000
<i>HcpA</i>	1304275	3	0,17	39,07	756331	9	0,20	45,04	365152	53	0,07	15,89	0,7392	0,0000	0,8411	0,0000	0,3907	0,0166
<i>ftsZ</i>	1096416	3	0,20	53,22	270250	9	0,04	11,91	677273	53	0,13	34,87	0,2547	0,0274	0,6513	0,0000	0,5322	0,0039
<i>fbpA</i>	1280584	3	0,20	47,92	486841	9	0,11	25,65	593182	53	0,11	26,43	0,4925	0,0000	0,7357	0,0000	0,4792	0,0068

Tabla B24: Incidencia de parasitoides en las distintas poblaciones de *C. parallelus* muestreadas a lo largo de los años. H= Individuos de *C. parallelus* analizados, T= Parasitoides detectados pertenecientes a la familia Tachinidae, N= Parasitoides detectados pertenecientes al *Phylum* Nematomorpha y sus respectivos porcentajes.

Población	T (Tachinidos)/N (Nematomorfos)/H (hospedadores) por cada año muestreado																			
	2005					2006					2007					2008				
	T (%)		N(%)		H	T (%)		N(%)		H	T (%)		N(%)		H	T (%)		N(%)		H
Busmayor																				
Valsain																				
Hoyos															0	0,00	1	6,25	16	
Pto. Pico																				
Navafría	16	0,06	0	0,00	283						7	6,48	0	0,00	108	0	0,00	0	0,00	26
Pto. Cantó															8	16,00	0	0,00	50	
Sabiñánigo						0	0,00	0	0,00	54	0	0,00	1	4,55	22	0	0,00	0	0,00	1
Biescas						0	0,00	0	0,00	59	0	0,00	13	39,39	33					
Escarilla						0	0,00	0	0,00	93	0	0,00	1	1,27	79	2	4,17	1	2,08	48
Sallent						0	0,00	0	0,00	194	2	0,59	17	5,00	340	2	4,17	0	0,00	48
Corral de Mulas						0	0,00	0	0,00	101	4	3,31	0	0,00	121	0	0,00	0	0,00	55
Pto. Viejo 2																				
Portalet						3	1,52	0	0,00	198	2	1,68	0	0,00	119	0	0,00	0	0,00	61
Pto. Viejo 4																				
Pto. Viejo 5																				
Cabaña Antigua						0	0,00	0	0,00	115	4	4,04	0	0,00	99	0	0,00	0	0,00	50
C.Tourmont						0	0,00	0	0,00	96	13	15,48	0	0,00	84	0	0,00	5	8,20	61
Soques						0	0,00	0	0,00	106	0	0,00	1	0,93	107	0	0,00	0	0,00	32
L´Herminie						0	0,00	0	0,00	92	0	0,00	0	0,00	97	0	0,00	7	14,29	49
Gabas						0	0,00	0	0,00	91	3	3,37	0	0,00	89	2	4,26	1	2,13	47
Arudy						2	1,98	0	0,00	101	1	1,54	0	0,00	65	0	0,00	1	1,52	66
Muna																0	0,00	4	7,69	52
Ortigueira						0	0,00	0	0,00	27	0	0,00	0	0,00	25					
Mañón																				
Col d l´Arche																				
Valdieri																				
K2																				
K1																				
LM1																				
QMT1																				
SR3																				

Población											Incidencia (total)				H (total)
	2009					2010									
	T (%)		N(%)		H	T (%)		N(%)		H	T	%	N	%	
Busmayor						0	0,00	16	61,54	26	0	0,00	16	61,54	26
Valsain	2	4,35	0	0,00	46						2	4,35	0	0,00	46
Hoyos	3	5,77	0	0,00	52						3	4,41	1	1,47	68
Pto. Pico	2	3,33	0	0,00	60						2	3,33	0	0,00	60
Navafria	0	0,00	0	0,00	80	0	0,00	0	0,00	36	23	4,32	0	0,00	533
Pto. Cantó											8	16,00	0	0,00	50
Sabiñánigo											0	0,00	1	1,30	77
Biescas											0	0,00	13	14,13	92
Escarrilla	2	2,22	0	0,00	90	4	8,89	2	4,44	45	8	2,25	4	1,13	355
Sallent	6	10,53	1	1,75	57	1	1,61	8	12,90	62	11	1,57	26	3,71	701
Corral de Mulas	0	0,00	0	0,00	59	0	0,00	0	0,00	58	4	1,02	0	0,00	394
Pto. Viejo 2	1	1,64	0	0,00	61						1	1,64	0	0,00	61
Portalet	0	0,00	0	0,00	117	2	2,30	2	2,30	87	7	1,20	2	0,34	582
Pto. Viejo 4	1	1,85	1	1,85	54						1	1,85	1	1,85	54
Pto. Viejo 5	12	22,22	2	3,70	54						12	22,22	2	3,70	54
Cabaña Antigua	3	5,77	2	3,85	52	0	0,00	3	6,00	50	7	1,91	5	1,37	366
C.Tourmont	7	10,45	0	0,00	67	10	16,67	7	11,67	60	30	8,15	12	3,26	368
Soques	0	0,00	0	0,00	60	0	0,00	3	6,38	47	0	0,00	4	1,14	352
L'Herminie	0	0,00	0	0,00	56	0	0,00	2	5,71	35	0	0,00	9	2,74	329
Gabas	1	1,59	1	1,59	63	9	14,52	3	4,84	62	15	4,26	5	1,42	352
Arudy	0	0,00	0	0,00	91	0	0,00	0	0,00	33	3	0,84	1	0,28	356
Muna											0	0,00	4	7,69	52
Ortigueira	2	3,28	0	0,00	61						2	1,77	0	0,00	113
Mañón	1	1,89	0	0,00	53						1	1,89	0	0,00	53
Col d l'Arche	0	0,00	1	3,85	26						0	0,00	1	3,85	26
Valdieri	0	0,00	2	4,26	47						0	0,00	2	4,26	47
K2	1	2,50	0	0,00	40						1	2,50	0	0,00	40
K1	1	2,50	0	0,00	40						1	2,50	0	0,00	40
LM1	3	7,50	0	0,00	40						3	7,50	0	0,00	40
QMT1	2	5,00	0	0,00	40						2	5,00	0	0,00	40
SR3	1	2,50	0	0,00	40						1	2,50	0	0,00	40
						incidencia media					148	3,43	109	3,84	5767



## ANEXO C: FRECUENCIAS DE INFECCIÓN

Tabla C1: Frecuencias absolutas y relativas de infección en las distintas poblaciones analizadas. \* Poblaciones excluidas de los análisis por representar datos anómalos. <sup>m</sup> Poblaciones analizadas por M. Zabal-Aguirre en el marco de su tesis doctoral y parcialmente publicadas por Zabal-Aguirre *et al.* (2010). <sup>j</sup> Poblaciones analizadas por el Dr. J. Sarasa en el marco de su tesis doctoral.

POBLACIÓN	FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INFECCIÓN					FRECUENCIAS RELATIVAS DE INFECCIÓN									
	Ø	F	B	FB	TOTAL	Ø	±2S	F	±2S	B	±2S	FB	±2S	TOTAL	
SABIÑÁNIGO 2004 <sup>m</sup>	0	22	0	0	22	0,00	0,04	1,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	1,00	
SABIÑÁNIGO 2006 <sup>m</sup>	7	43	1	3	54	0,13	0,05	0,80	0,05	0,02	0,02	0,06	0,03	1,00	
SABIÑÁNIGO 2007 <sup>m</sup>	0	20	1	1	22	0,00	0,04	0,91	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	1,00	
BIESCAS 2004 <sup>m</sup>	11	23	6	12	52	0,21	0,06	0,44	0,07	0,12	0,04	0,23	0,06	1,00	
BIESCAS 2005 <sup>m</sup>	0	29	1	14	44	0,00	0,02	0,66	0,07	0,02	0,03	0,32	0,07	1,00	
BIESCAS 2006 <sup>m</sup>	6	19	4	30	59	0,10	0,04	0,32	0,06	0,07	0,03	0,51	0,06	1,00	
BIESCAS 2007	0	19	0	14	33	0,00	0,03	0,58	0,08	0,00	0,03	0,42	0,08	1,00	
ESCARRILLA 2002 <sup>m</sup>	19	65	9	19	112	0,17	0,04	0,58	0,05	0,08	0,03	0,17	0,04	1,00	
ESCARRILLA 2003 <sup>m</sup>	43	65	8	36	152	0,28	0,04	0,43	0,04	0,05	0,02	0,24	0,03	1,00	
ESCARRILLA 2005 <sup>m</sup>	17	39	7	44	107	0,16	0,04	0,36	0,05	0,07	0,02	0,41	0,05	1,00	
ESCARRILLA 2006 <sup>m</sup>	34	39	5	15	93	0,37	0,05	0,42	0,05	0,05	0,02	0,16	0,04	1,00	
ESCARRILLA 2007	11	43	3	21	78	0,14	0,04	0,55	0,05	0,04	0,02	0,27	0,05	1,00	
ESCARRILLA 2008*	19	7	3	9	28	0,50	0,08	0,18	0,06	0,08	0,05	0,24	0,07	1,00	
ESCARRILLA 2009 <sup>j</sup>	42	34	5	7	88	0,48	0,05	0,39	0,05	0,06	0,03	0,08	0,03	1,00	
ESCARRILLA 2010	10	17	2	8	37	0,27	0,07	0,46	0,08	0,05	0,04	0,22	0,07	1,00	
SALLENT 2002 <sup>m</sup>	4	11	19	58	92	0,04	0,02	0,12	0,03	0,21	0,04	0,63	0,05	1,00	
SALLENT 2003 <sup>m</sup>	2	2	28	78	110	0,02	0,02	0,02	0,02	0,25	0,04	0,71	0,04	1,00	
SALLENT 2004 <sup>m</sup>	9	9	42	73	133	0,07	0,02	0,07	0,02	0,32	0,04	0,55	0,04	1,00	
SALLENT 2005 <sup>m</sup>	3	2	20	89	114	0,03	0,02	0,02	0,01	0,18	0,04	0,78	0,04	1,00	
SALLENT 2006 <sup>m</sup>	10	2	36	146	194	0,05	0,02	0,01	0,01	0,19	0,03	0,75	0,03	1,00	

POBLACIÓN	FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INFECCIÓN					FRECUENCIAS RELATIVAS DE INFECCIÓN									
	Ø	F	B	FB	TOTAL	Ø	±2S	F	±2S	B	±2S	FB	±2S	TOTAL	
SALLENT 2007	3	5	75	237	320	0,01	0,01	0,02	0,01	0,23	0,02	0,74	0,02	1,00	
SALLENT 2008	3	3	12	30	48	0,06	0,04	0,06	0,04	0,25	0,06	0,63	0,07	1,00	
SALLENT 2009J	9	5	16	21	51	0,18	0,05	0,10	0,04	0,31	0,06	0,41	0,07	1,00	
SALLENT 2010	11	1	2	48	62	0,18	0,05	0,02	0,02	0,03	0,03	0,77	0,05	1,00	
C.MULAS 2003*m	16	74	13	68	171	0,09	0,02	0,43	0,04	0,08	0,02	0,40	0,04	1,00	
C.MULAS 2005m	49	10	10	44	113	0,43	0,05	0,09	0,03	0,09	0,03	0,39	0,05	1,00	
C.MULAS 2006m	50	12	20	19	101	0,50	0,05	0,12	0,03	0,20	0,04	0,19	0,04	1,00	
C.MULAS 2007	50	19	15	38	122	0,41	0,04	0,16	0,03	0,12	0,03	0,31	0,04	1,00	
C.MULAS 2008*	41	9	0	4	54	0,76	0,06	0,17	0,05	0,00	0,02	0,07	0,04	1,00	
C.MULAS 2009	25	7	10	17	59	0,42	0,06	0,12	0,04	0,17	0,05	0,29	0,06	1,00	
C.MULAS 2010	30	2	7	19	58	0,52	0,06	0,03	0,03	0,12	0,04	0,33	0,06	1,00	
PORTALET 2002*m	36	24	25	22	107	0,34	0,04	0,22	0,04	0,23	0,04	0,21	0,04	1,00	
PORTALET 2003*m	49	53	10	18	130	0,38	0,04	0,41	0,04	0,08	0,02	0,14	0,03	1,00	
PORTALET 2004*m	27	44	5	18	94	0,29	0,05	0,47	0,05	0,05	0,02	0,19	0,04	1,00	
PORTALET 2005J	110	17	19	18	164	0,67	0,04	0,10	0,02	0,12	0,03	0,11	0,02	1,00	
PORTALET 2006m	138	9	49	2	198	0,70	0,03	0,05	0,02	0,25	0,03	0,01	0,01	1,00	
PORTALET 2007	85	4	9	21	119	0,71	0,04	0,03	0,02	0,08	0,02	0,18	0,03	1,00	
PORTALET 2008	36	14	2	9	61	0,59	0,06	0,23	0,05	0,03	0,03	0,15	0,05	1,00	
PORTALET 2009J-parcial	69	12	10	0	91	0,76	0,04	0,13	0,04	0,11	0,03	0,00	0,01	1,00	
PORTALET 2010	32	5	5	0	42	0,76	0,06	0,12	0,05	0,12	0,05	0,00	0,02	1,00	
C.ANTIGUA 2003*m	40	60	3	17	120	0,33	0,04	0,50	0,04	0,03	0,02	0,14	0,03	1,00	
C.ANTIGUA 2005m	93	0	6	9	108	0,86	0,03	0,00	0,01	0,06	0,02	0,08	0,03	1,00	
C.ANTIGUA 2006m	88	1	22	3	114	0,77	0,04	0,01	0,01	0,19	0,04	0,03	0,02	1,00	
C.ANTIGUA 2007	68	1	10	20	99	0,69	0,05	0,01	0,01	0,10	0,03	0,20	0,04	1,00	
C.ANTIGUA 2008	40	3	2	5	50	0,80	0,06	0,06	0,04	0,04	0,03	0,10	0,04	1,00	
C.ANTIGUA 2009	44	0	6	1	51	0,86	0,05	0,00	0,02	0,12	0,05	0,02	0,03	1,00	
C.ANTIGUA 2010	42	0	8	0	50	0,84	0,05	0,00	0,02	0,16	0,05	0,00	0,02	1,00	
C.TOURMONT 2003*m	56	42	9	20	127	0,44	0,04	0,33	0,04	0,07	0,02	0,16	0,03	1,00	
C.TOURMONT 2005m	71	7	16	6	100	0,71	0,04	0,07	0,03	0,16	0,04	0,06	0,02	1,00	

POBLACIÓN	FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INFECCIÓN					FRECUENCIAS RELATIVAS DE INFECCIÓN								
	Ø	F	B	FB	TOTAL	Ø	±2S	F	±2S	B	±2S	FB	±2S	TOTAL
C.TOURMONT 2006 <sup>m</sup>	58	5	31	2	96	0,60	0,05	0,05	0,02	0,32	0,05	0,02	0,02	1,00
C.TOURMONT 2007	61	7	15	1	84	0,73	0,05	0,08	0,03	0,18	0,04	0,01	0,02	1,00
C.TOURMONT 2008	45	5	9	1	60	0,75	0,05	0,08	0,04	0,15	0,05	0,02	0,02	1,00
C.TOURMONT 2009	46	4	10	3	63	0,73	0,05	0,06	0,03	0,16	0,05	0,05	0,03	1,00
C.TOURMONT 2010	45	0	14	0	59	0,76	0,05	0,00	0,02	0,24	0,05	0,00	0,02	1,00
SOQUES 2005 <sup>m</sup>	64	5	12	26	107	0,60	0,05	0,05	0,02	0,11	0,03	0,24	0,04	1,00
SOQUES 2006 <sup>m</sup>	61	13	26	6	106	0,58	0,05	0,12	0,03	0,25	0,04	0,06	0,02	1,00
SOQUES 2007	74	3	13	17	107	0,69	0,04	0,03	0,02	0,12	0,03	0,16	0,04	1,00
SOQUES 2008	20	2	7	3	32	0,63	0,08	0,06	0,05	0,22	0,07	0,09	0,05	1,00
SOQUES 2009	27	3	18	11	59	0,46	0,06	0,05	0,03	0,31	0,06	0,19	0,05	1,00
SOQUES 2010	25	6	7	8	46	0,54	0,07	0,13	0,05	0,15	0,05	0,17	0,06	1,00
L'HERMINE 2005 <sup>m</sup>	45	4	11	35	95	0,47	0,05	0,04	0,02	0,12	0,03	0,37	0,05	1,00
L'HERMINE 2006 <sup>m</sup>	33	14	33	12	92	0,36	0,05	0,15	0,04	0,36	0,05	0,13	0,04	1,00
L'HERMINE 2007	60	11	9	17	97	0,62	0,05	0,11	0,03	0,09	0,03	0,18	0,04	1,00
L'HERMINE 2008	24	4	15	5	48	0,50	0,07	0,08	0,04	0,31	0,06	0,10	0,05	1,00
L'HERMINE 2009	23	6	16	10	55	0,42	0,06	0,11	0,04	0,29	0,06	0,18	0,05	1,00
L'HERMINE 2010	18	4	5	7	34	0,53	0,08	0,12	0,06	0,15	0,06	0,21	0,07	1,00
GABAS 2002 <sup>*m</sup>	58	26	7	2	93	0,62	0,05	0,28	0,05	0,08	0,03	0,02	0,02	1,00
GABAS 2003 <sup>*m</sup>	69	25	10	5	109	0,63	0,05	0,23	0,04	0,09	0,03	0,05	0,02	1,00
GABAS 2005 <sup>m</sup>	80	15	3	13	111	0,72	0,04	0,14	0,03	0,03	0,02	0,12	0,03	1,00
GABAS 2006 <sup>m</sup>	71	15	4	1	91	0,78	0,04	0,16	0,04	0,04	0,02	0,01	0,01	1,00
GABAS 2007	65	5	1	18	89	0,73	0,05	0,06	0,03	0,01	0,02	0,20	0,04	1,00
GABAS 2008	30	6	6	3	45	0,67	0,07	0,13	0,05	0,13	0,05	0,07	0,04	1,00
GABAS 2009 <sup>j</sup>	36	9	10	8	63	0,57	0,06	0,14	0,04	0,16	0,05	0,13	0,04	1,00
GABAS 2010	31	5	2	5	43	0,72	0,07	0,12	0,05	0,05	0,04	0,12	0,05	1,00
ARUDY 2003 <sup>*m</sup>	46	23	20	7	96	0,48	0,05	0,24	0,04	0,21	0,04	0,07	0,03	1,00
ARUDY 2005 <sup>m</sup>	68	3	14	17	102	0,67	0,05	0,03	0,02	0,14	0,03	0,17	0,04	1,00
ARUDY 2006 <sup>m</sup>	59	5	30	6	100	0,59	0,05	0,05	0,02	0,30	0,05	0,06	0,02	1,00
ARUDY 2007	40	6	16	3	65	0,62	0,06	0,09	0,04	0,25	0,05	0,05	0,03	1,00

POBLACIÓN	FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INFECCIÓN					FRECUENCIAS RELATIVAS DE INFECCIÓN									
	Ø	F	B	FB	TOTAL	Ø	±2S	F	±2S	B	±2S	FB	±2S	TOTAL	
ARUDY 2008	20	1	13	0	34	0,59	0,08	0,03	0,04	0,38	0,08	0,00	0,03	1,00	
ARUDY 2009	71	2	9	8	90	0,79	0,04	0,02	0,02	0,10	0,03	0,09	0,03	1,00	
ARUDY 2010	20	2	10	1	33	0,61	0,08	0,06	0,05	0,30	0,08	0,03	0,04	1,00	
NAVAFRÍA 2002 <sup>m</sup>	10	77	3	22	112	0,09	0,03	0,69	0,04	0,03	0,02	0,20	0,04	1,00	
NAVAFRÍA 2003 <sup>m</sup>	19	51	3	8	81	0,23	0,05	0,63	0,05	0,04	0,02	0,10	0,03	1,00	
NAVAFRÍA 2005	10	181	28	66	285	0,04	0,01	0,64	0,03	0,10	0,02	0,23	0,02	1,00	
NAVAFRÍA 2007	22	36	17	33	108	0,20	0,04	0,33	0,04	0,16	0,03	0,31	0,04	1,00	
NAVAFRÍA 2008*	0	8	4	10	22	0,00	0,04	0,36	0,09	0,18	0,08	0,45	0,10	1,00	
NAVAFRÍA 2009	28	36	1	9	74	0,38	0,06	0,49	0,06	0,01	0,02	0,12	0,04	1,00	
HOYOS 2008*	3	2	0	9	14	0,21	0,10	0,14	0,09	0,00	0,06	0,64	0,11	1,00	
HOYOS 2009	23	16	6	7	52	0,44	0,07	0,31	0,06	0,12	0,04	0,13	0,05	1,00	
ORTIGUEIRA 2006 <sup>m</sup>	32	0	10	2	44	0,73	0,06	0,00	0,02	0,23	0,06	0,05	0,04	1,00	
ORTIGUEIRA 2007*	6	1	17	0	24	0,25	0,08	0,04	0,05	0,71	0,09	0,00	0,04	1,00	
ORTIGUEIRA 2009	31	0	16	9	56	0,55	0,06	0,00	0,02	0,29	0,06	0,16	0,05	1,00	
CANENCIA2005 <sup>m</sup>	6	74	1	24	105	0,06	0,02	0,70	0,04	0,01	0,01	0,23	0,04	1,00	
CANENCIA2009	6	27	4	19	56	0,11	0,04	0,48	0,06	0,07	0,04	0,34	0,06	1,00	
SOMOSIERRA 2009	4	20	12	40	76	0,05	0,03	0,26	0,05	0,16	0,04	0,53	0,06	1,00	
MORCUERA 2005 <sup>m</sup>	9	63	3	21	96	0,09	0,03	0,66	0,05	0,03	0,02	0,22	0,04	1,00	
MORCUERA 2009	9	52	5	27	93	0,10	0,03	0,56	0,05	0,05	0,02	0,29	0,05	1,00	
TARAMUNDI 2008	57	2	6	4	69	0,83	0,05	0,03	0,02	0,09	0,03	0,06	0,03	1,00	
TARAMUNDI 2009	73	1	0	3	77	0,95	0,03	0,01	0,02	0,00	0,01	0,04	0,02	1,00	
PTO. CANTO 2008	21	22	0	6	49	0,43	0,07	0,45	0,07	0,00	0,02	0,12	0,05	1,00	
MUNA 2008	21	5	19	7	52	0,40	0,07	0,10	0,04	0,37	0,06	0,13	0,05	1,00	
MAÑÓN 2009	73	1	9	5	88	0,83	0,04	0,01	0,02	0,10	0,03	0,06	0,03	1,00	
VALSAIN 2009	14	18	8	15	55	0,25	0,06	0,33	0,06	0,15	0,05	0,27	0,06	1,00	
PTO. DEL PICO 2009	18	34	1	17	70	0,26	0,05	0,49	0,06	0,01	0,02	0,24	0,05	1,00	
COL DE L'ARCHE 2009	16	0	5	0	21	0,76	0,09	0,00	0,04	0,24	0,09	0,00	0,04	1,00	
VALDIERI CENTRO 2009	30	2	13	1	46	0,65	0,07	0,04	0,03	0,28	0,06	0,02	0,03	1,00	

POBLACIÓN	FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INFECCIÓN					FRECUENCIAS RELATIVAS DE INFECCIÓN								
	Ø	F	B	FB	TOTAL	Ø	±2S	F	±2S	B	±2S	FB	±2S	TOTAL
BUSMAYOR 2009	19	1	4	2	26	0,73	0,08	0,04	0,05	0,15	0,07	0,08	0,06	1,00
BUBION 2004 <sup>m</sup>	2	47	0	4	53	0,04	0,03	0,89	0,04	0,00	0,02	0,08	0,04	1,00
EPPING FOREST 2002 <sup>m</sup>	6	0	7	2	15	0,40	0,11	0,00	0,05	0,47	0,11	0,13	0,09	1,00
BECEDAS 2007*	36	13	14	32	95	0,38	0,05	0,14	0,04	0,15	0,04	0,34	0,05	1,00
EL ESPINAR 2008*	31	7	0	31	69	0,45	0,06	0,10	0,04	0,00	0,01	0,45	0,06	1,00
VIELHA 2008	28	8	1	1	38	0,74	0,07	0,21	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	1,00
POUSADOIRO 2009	35	0	3	0	38	0,92	0,05	0,00	0,02	0,08	0,05	0,00	0,02	1,00
LUGO 2009	9	0	1	1	11	0,82	0,11	0,00	0,07	0,09	0,09	0,09	0,09	1,00
TARAMUNDI2 2009	12	2	2	2	18	0,67	0,10	0,11	0,08	0,11	0,08	0,11	0,08	1,00
URKAREGUI 2009	35	7	6	1	49	0,71	0,06	0,14	0,05	0,12	0,05	0,02	0,03	1,00
TXABARRI 2009	9	0	0	1	10	0,90	0,10	0,00	0,07	0,00	0,07	0,10	0,10	1,00
ALAVA 1 2009	33	12	1	1	47	0,70	0,06	0,26	0,06	0,02	0,03	0,02	0,03	1,00
ALAVA 2 2009	42	4	3	0	49	0,86	0,05	0,08	0,04	0,06	0,04	0,00	0,02	1,00
NAVARRA 2009	13	1	1	0	15	0,87	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00	0,05	1,00
TUDANCA 2009	50	1	2	3	56	0,89	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03	0,05	0,03	1,00
CERVERA 2009	17	1	2	5	25	0,68	0,09	0,04	0,05	0,08	0,06	0,20	0,08	1,00
PIEDRASLUENGAS 2009	38	9	4	1	52	0,73	0,06	0,17	0,05	0,08	0,04	0,02	0,03	1,00
PLAT. GREDOS 2009	12	17	5	26	60	0,20	0,05	0,28	0,06	0,08	0,04	0,43	0,06	1,00
L'ARGENTERA 2009	2	0	6	0	8	0,25	0,13	0,00	0,08	0,75	0,13	0,00	0,08	1,00
VALDIERI PUENTE 2009	25	1	5	0	31	0,81	0,07	0,03	0,04	0,16	0,07	0,00	0,03	1,00
THURINGIA 2009	28	0	60	1	89	0,31	0,05	0,00	0,01	0,67	0,05	0,01	0,02	1,00
SAXONIA 2009	53	0	50	1	104	0,51	0,05	0,00	0,01	0,48	0,05	0,01	0,01	1,00
SLOVENIA 2009	0	40	4	5	49	0,00	0,02	0,82	0,05	0,08	0,04	0,10	0,04	1,00
ROGALAND2009	0	0	56	0	56	0,00	0,02	0,00	0,02	1,00	0,02	0,00	0,02	1,00
TELEMARK 2009	0	0	12	0	12	0,00	0,06	0,00	0,06	1,00	0,06	0,00	0,06	1,00
CAPILEIRA 2010 <sup>J</sup>	3	20	0	4	27	0,11	0,06	0,74	0,08	0,00	0,03	0,15	0,07	1,00
OREA 2010	8	0	0	46	54	0,15	0,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,85	0,05	1,00

POBLACIÓN	FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INFECCIÓN					FRECUENCIAS RELATIVAS DE INFECCIÓN									
	Ø	F	B	FB	TOTAL	Ø	±2S	F	±2S	B	±2S	FB	±2S	TOTAL	
INGLATERRA1 2011	16	75	0	24	115	0,14	0,03	0,65	0,04	0,00	0,01	0,21	0,04	1,00	
INGLATERRA2 2011	3	56	0	0	59	0,05	0,03	0,95	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02	1,00	
BALBOA 2011	3	0	1	0	4	0,75	0,17	0,00	0,13	0,25	0,17	0,00	0,13	1,00	
TENERIFE 2011	12	0	0	0	12	1,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,06	1,00	
BELAS KNAP 2012	6	9	10	6	31	0,19	0,07	0,29	0,08	0,32	0,08	0,19	0,07	1,00	
CERNE ABBAB 2012	16	0	18	4	38	0,42	0,08	0,00	0,02	0,47	0,08	0,11	0,05	1,00	
EPPING FOREST 2012	11	0	14	6	31	0,35	0,08	0,00	0,03	0,45	0,08	0,19	0,07	1,00	
MOUNT CABURN 2012	15	0	5	4	24	0,63	0,09	0,00	0,04	0,21	0,08	0,17	0,07	1,00	
RED HILL 2012	23	0	8	2	33	0,70	0,08	0,00	0,03	0,24	0,07	0,06	0,05	1,00	
RIEVAUX 2012	0	25	0	5	30	0,00	0,03	0,83	0,07	0,00	0,03	0,17	0,07	1,00	

## ANEXO D: DATOS MLST.

Tabla D1: Archivos alélicos de los distintos individuos analizados en el sistema de clasificación multi-locus (MLST). Los individuos que no han podido ser caracterizados completamente por fallo reiterado de alguno de los marcadores se indican como “incompletos”. En aquellos casos en los que un determinado alelo presenta dudas, debido a la calidad de las secuencias o cualquier otro factor experimental, se indica con un signo de interrogación.

Individuo	Población	ST	Categoría	Supergrupo	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>
“Norte”										
664	ALAVA		Incompleto	F	2	1	?	2	1	
666	ALAVA	9	R	F	2	1	1	1	2	1
668	ALAVA		Incompleto	F	3		2	1	2	
680	ALAVA	10	F	F	2	1	1	2	1	
682	ALAVA	10	F	F	2	1	1	2	1	1
725	ALAVA		Incompleto	F	2		1		4	3
550	ASTURIAS		Incompleto	F			1			1
567	ASTURIAS		Incompleto	F		3?	10	3	2	
579	URKAREGUI	17	B	B	3	5	5	1	2	
580	URKAREGUI	17	B	B	3	5	5	1	2	
595	URKAREGUI	17	B	B	3	5	5	1	2	
598	URKAREGUI	17	B	B	3	5	5	1	2	
“ZH_Francia”										
131	ARUDY		Incompleto	F	2	2	3	2		
1188	ARUDY	12	R	F	2	2	3	2	5	
1202	ARUDY	6	B	B	1	5	5	1	2	1
1231	ARUDY	2	R	F	1	2	3	2	5	
1234	ARUDY		Incompleto	B	1	5	5		2	
401	GABAS	12	R	F	2	2	3	2	5	
403	GABAS	12	R	F	2	2	3	2	5	

Individuo	Población	ST	Categoría	Supergrupo	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>
407	GABAS	12	R	F	2	2	3	2	5	
1096	GABAS	12	R	F	2	2	3	2	5	
352	HERMINIE	12	R	F	2	2	3	2	5	4
356	HERMINIE	12	R	F	2	2	3	2	5	
372	HERMINIE	12	R	F	2	2	3	2	5	5
394	HERMINIE	12	R	F	2	2	3	2	5	5
990	HERMINIE	12	R	F	2	2	3	2	5	4
1068	HERMINIE	6	B	B	1	5	5	1	2	1
1069	HERMINIE	6	B	B	1	5	5	1	2	1
328	SOQUES	12	R	F	2	2	3	2	5	6
924	SOQUES	Incompleto		F	2	2	3		5	3
926	SOQUES	7	B	B	1	5	5	1	3	
762	MUNA	8	R	B	1	5	5	2	2	
767	MUNA	1	R	F	1	1	5	1	5	
"Bubiión"										
194	BUBIÓN	11	F	F	2	1	3	2	5	4
196	BUBIÓN	11	F	F	2	1	3	2	5	4
232	BUBIÓN	11	F	F	2	1	3	2	5	4
"CM"										
90	CMULAS	15	R	F	3	2	6	5	3	1
92	CMULAS	16	B	B	3	2	7	1	3	1
94	CMULAS	16	B	B	3	2	7	1	3	
105	CMULAS	14	B	B	3	2	4	1	3	2
108	CMULAS	23	R	F	4	4	6	4	4	5
112	CMULAS	19	R	F	4	2	6	5	4	3
124	CMULAS	18	R	F	4	2	6	5	3	1
125	CMULAS	19	R	F	4	2	6	5	4	3



Individuo	Población	ST	Categoría	Supergrupo	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>
134	CMULAS	24	F	F	4	4	6	5	4	3
“Escarrilla”										
2	ESCARRILLA	23	R	F	4	4	6	4	4	3
7	ESCARRILLA	24	F	F	4	4	6	5	4	3
9	ESCARRILLA	24	F	F	4	4	6	5	4	3
10	ESCARRILLA	23	R	F	4	4	6	4	4	3
14	ESCARRILLA	4	R	F	1	4	8	4	1	
56	ESCARRILLA	24	F	F	4	4	6	5	4	
80	ESCARRILLA	3	B	B	1	2	5	1	2	
113	ESCARRILLA	Incompleto		F	4		6	5	1	1
121	ESCARRILLA	Incompleto		F	4		8	5	1	
“Inglaterra”										
546	INGLATERRA	6	B	B	1	5	5	1	2	1
547	INGLATERRA	6	B	B	1	5	5	1	2	1
548	INGLATERRA	6	B	B	1	5	5	1	2	1
“Alpes”										
1512	L’ARGENTERA	6	B	B	1	5	5	1	2	
1484	C.L’ARCHE	6	B	B	1	5	5	1	2	
1541	VALDIERI	6	B	B	1	5	5	1	2	
1559	VALDIERI	11	F	F	2	1	3	2	5	
1560	VALDIERI	11	F	F	2	1	3	2	5	
1571	VALDIERI	11	F	F	2	1	3	2	5	
“Centro”										
478	NAVAFRIA	25	F	F	4	4	8	5	1	5
481	NAVAFRIA	25	F	F	4	4	8	5	1	5
482	NAVAFRIA	25	F	F	4	4	8	5	1	5
483	NAVAFRIA	Incompleto		F	4	4	?	5	1	5

Individuo	Población	ST	Categoría	Supergrupo	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>
484	NAVAFRIA	25	F	F	4	4	8	5	1	5
1263	NAVAFRIA	25	F	F	4	4	8	5	1	5
1294	NAVAFRIA	25	F	F	4	4	8	5	1	
1338	NAVAFRIA	3	B	B	1	2	5	1	2	
1386	BECEDAS	Incompleto		F	?	4	8	5	2	1
1389	BECEDAS	3	B	B	1	2	5	1	2	1
1404	BECEDAS	3	B	B	1	2	5	1	2	1
605	SEGOVIA	Incompleto		F	4		8	5	1	5
“Noruega”										
3041	NORUEGA	Incompleto		B						1
3042	NORUEGA	Incompleto		B						1
3043	NORUEGA	Incompleto		B						1
3044	NORUEGA	Incompleto		B						1
3045	NORUEGA	Incompleto		B						1
3047	NORUEGA	Incompleto		B						1
“Portalet”										
158	PORTALET	27	R	F	4	6	6	3	3	
164	PORTALET	28	R	F	4	6	6	5	4	
172	PORTALET	28	R	F	4	6	6	5	4	5
183	PORTALET	3	B	B	1	2	5	1	2	1
597	PORTALET	16	B	B	3	2	7	1	3	
607	PORTALET	22	R	F	4	3	9	3	3	3
614	PORTALET	Incompleto		F	4			5	1	
1484	PORTALET	30	R	B	5	2	2	1	2	1
CRU104	PORTALET	28	R	F	4	6	6	5	4	3
CRU151	PORTALET	29	R	F	4	6	7	3	3	
CRU154	PORTALET	28	R	F	4	6	6	5	4	3

Individuo	Población	ST	Categoría	Supergrupo	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>
CRU21	PORTALET	33	B	B	5	6	7	3	3	
CRU23	PORTALET	28	R	F	4	6	6	5	4	3
CRU54	PORTALET	31	B	B	5	3	7	3	3	3
CRU61	PORTALET	21	R	F	4	3	9	2	4	3
CRU64	PORTALET	21	R	F	4	3	9	2	4	3
CRU69	PORTALET	19	R	F	4	2	6	5	4	
"Pto. Canto"										
662	PTOCANTO	25	F	F	4	4	8	5	1	5
663	PTOCANTO	25	F	F	4	4	8	5	1	5
664	PTOCANTO	25	F	F	4	4	8	5	1	5
665	PTOCANTO	Incompleto		F	4	4	8		1	
667	PTOCANTO	25	F	F	4	4	8	5	1	5
673	PTOCANTO	25	F	F	4	4	8	5	1	5
2	SABIÑANIGO	Incompleto		F	4	4			1	5
19	SABIÑANIGO	26	R	B	4	5	4	1	2	1
"Sallent"										
57	SALLENT	14	B	B	3	2	4	1	3	1
79	SALLENT	13	B	B	3	2	2	1	3	1
86	SALLENT	14	B	B	3	2	4	1	3	1
228	SALLENT	13	B	B	3	2	2	1	3	1
241	SALLENT	25	F	F	4	4	8	5	1	5
"Eslovenia"										
2991	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	4
2992	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	4
2993	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	4
2994	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	4
2995	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	4

Individuo	Población	ST	Categoría	Supergrupo	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>
3006	SLOVENIA	6	B	B	1	5	5	1	2	1
3016	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	4
3025	SLOVENIA	11	F	F	2	1	3	2	5	1
1615	THURINGIA		Incompleto	F						
1664	THURINGIA		Incompleto	B						
1665	THURINGIA		Incompleto	B						
1666	THURINGIA		Incompleto	F						
1668	THURINGIA		Incompleto	F						
"C. Tourmont"										
256	TOURMONT	20	R	F	4	2	9	5	4	3
800	TOURMONT	32	B	B	5	6	7	1	2	
801	TOURMONT	21	R	F	4	3	9	2	4	3
836	TOURMONT		Incompleto	B						1
"Vielha"										
150	VIELHA	6	R	B	1	5	5	1	2	
711	VIELHA	6	R	B	1	5	5	1	2	
722	VIELHA	6	R	B	1	5	5	1	2	1
731	VIELHA	5	R	F	1	5	3	1	2	1

## ANEXO E: MUESTREO GENÉTICO

Tabla E1: Parte de las secuencias empleadas para el análisis del gen *16S rRNA*, disponibles en las bases de datos.

GenBank	Género	Supergrupo	Orden
AF397408	<i>Aedes albopictus</i>	A	Diptera
AY876253	<i>Drosophila innubila</i>	A	Diptera
DQ412083	<i>Drosophila melanogaster</i>	A	Diptera
AF468033	<i>Drosophila sechellia</i>	A	Diptera
AF468034	<i>Drosophila simulans</i>	A	Diptera
AB360384	<i>Ephestia kuehniella</i>	A	Lepidoptera
X65671	<i>Ephestia kuehniella</i>	A	Lepidoptera
GU592785	<i>Formica aquilonia</i>	A	Himenoptera
GU592784	<i>Formica aquilonia</i>	A	Himenoptera
GU592780	<i>Formica cinerea</i>	A	Himenoptera
GU592781	<i>Formica cinerea</i>	A	Himenoptera
GU592789	<i>Formica lugubris</i>	A	Himenoptera
GU592788	<i>Formica polyctena</i>	A	Himenoptera
GU592782	<i>Formica rufa</i>	A	Himenoptera
AY026913	<i>Lycoriella solani</i>	E	Diptera
AY026912	<i>Lycoriella solani</i>	E	Diptera
L02882	<i>Muscidifurax uniraptor</i>	A	Himenoptera
EU780684	<i>Phlebotomus papatasi</i>	A	Diptera
AY227741	<i>Rhagoletis cerasi</i>	A	Diptera
AY227740	<i>Rhagoletis cerasi</i>	A	Diptera
AJ223238	<i>Armadillidium vulgare</i>	B	Isoptera
X65669	<i>Armadillidium vulgare</i>	B	Isoptera
AY566425	<i>Chelymorpha alternans</i>	B	Coleoptera
AY566424	<i>Chelymorpha alternans</i>	B	Coleoptera
FJ438533	<i>Chorthippus parallelus strain wCpar_01</i>	B	Orthoptera
FJ438534	<i>Chorthippus parallelus strain wCpar_02</i>	B	Orthoptera
U23709	<i>Culex pipiens</i>	B	Diptera
X65670	<i>Culex pipiens</i>	B	Diptera
DQ412085	<i>Drosophila simulans</i>	B	Diptera
AY227742	<i>Drosophila simulans</i>	B	Diptera
AF045189	<i>Encarsia formosa</i>	B	Himenoptera
AB073730	<i>Hishimonoides sellatiformis</i>	B	Hemiptera
AB073732	<i>Hishimonus sellatus</i>	B	Hemiptera
U44046	<i>Tetranychus urticae</i>	B	Prostigmata
X65674	<i>Tribolium confusum</i>	B	Coleoptera
X65675	<i>Trichogramma cordubensis</i>	B	Himenoptera
L02886	<i>Trichogramma deion</i>	B	Himenoptera
L02888	<i>Trichogramma deion</i>	B	Himenoptera
L02884	<i>Trichogramma deion</i>	B	Himenoptera
L02885	<i>Trichogramma deion</i>	B	Himenoptera
L02887	<i>Trichogramma deion</i>	B	Himenoptera
L02883	<i>Trichogramma deion</i>	B	Himenoptera
AF051145	<i>Brugia malayi</i>	D	Spurida
AF093511	<i>Brugia pahangi</i>	D	Spurida
AF093510	<i>Wuchereria bancrofti</i>	D	Spurida
AF179630	<i>Folsomia candida</i>	E	Collembola
DQ288985	<i>Cameronieta strandmanni</i>	F	Mesostigmata
FJ438535	<i>Chorthippus parallelus strain wCpar_03</i>	F	Orthoptera
FJ438536	<i>Chorthippus parallelus strain wCpar_04</i>	F	Orthoptera
FJ438537	<i>Chorthippus parallelus strain wCpar_05</i>	F	Orthoptera
FJ438538	<i>Chorthippus parallelus strain wCpar_06</i>	F	Orthoptera
AB475140	<i>Cimex lectularius</i>	F	Heteroptera
GQ422897	<i>Odontotermes homi</i>	F	Isoptera
GQ422899	<i>Odontotermes sp</i>	F	Isoptera
GQ422898	<i>Odontotermes sp</i>	F	Isoptera
AB073729	<i>Hishimonoides sellatiformis</i>		Himenoptera
AB073731	<i>Hishimonus sellatus</i>		Hemiptera
X65672	<i>Laodelphax striatellus</i>		Hemiptera
U44044	<i>Metaseiulus occidentalis</i>		Mesostigmata
U44045	<i>Metaseiulus occidentalis</i>		Mesostigmata
X65673	<i>Porcellio dilatatus petiti</i>		
GQ206310	<i>Sogatella furcifera</i>		Hemiptera

Tabla E2: Parte de las secuencias empleadas en el análisis filogenético basado en los genes del Sistema de Clasificación Multilocus ordenadas en función del ST asignado, disponibles en las bases de datos. Obsérvese en color azul y naranja respectivamente los complejos clonales correspondientes al los complejos ST-13 y ST-9.

ST	Genero	especie	Orden	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Complejo ST
1	<i>Drosophila</i>	<i>melanogaster</i>	Diptera	A	1	1	1	1	1	1 ST-13
2	<i>Aedes albopictus</i>	<i>albopictus</i>	Diptera	A	3	2	2	10	3	-
3	<i>Acraea encedon</i>	<i>encedon</i>	Lepidoptera	B	9	11	12	11	12	-
4	<i>Acraea eponina</i>	<i>eponina</i>	Lepidoptera	B	12	12	13	2	22	-
5	<i>Acromis sparsa</i>	<i>sparsa</i>	Coleoptera	A	23	2	26	21	26	-
6	<i>Armadillidium</i>	<i>vulgare</i>	Isopoda	B	13	13	14	9	13	-
7	<i>Chelymorpha</i>	<i>alternans</i>	Coleoptera	B	9	14	15	12	14	-
8	<i>Cimex</i>	<i>lectularius</i>	Heteroptera	F	26	27	31	24	28	-
9	<i>Culex</i>	<i>pipiens</i>	Diptera	B	4	3	3	22	4	-
10	<i>Drosophila</i>	<i>innubila</i>	Diptera	A	1	1	1	3	2	ST-13
10	<i>Drosophila</i>	<i>munda</i>	Diptera	A	1	1	1	3	2	ST-13
11	<i>Drosophila</i>	<i>neotestacea</i>	Diptera	A	10	10	11	14	24	ST-a
12	<i>Drosophila</i>	<i>orientacea</i>	Diptera	A	10	10	11	14	11	ST-a
13	<i>Drosophila</i>	<i>recens</i>	Diptera	A	1	1	1	3	1	ST-13
13	<i>Leucophenga</i>	<i>maculosa</i>	Diptera	A	1	1	1	3	1	ST-13
13	<i>Suillia</i>	<i>sp</i>	Diptera	A	1	1	1	3	1	ST-13
14	<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>	Diptera	A	1	1	27	3	1	ST-13
15	<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>	Diptera	B	5	4	5	4	6	ST-b
16	<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>	Diptera	B	5	4	4	4	5	ST-b
17	<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>	Diptera	A	22	23	24	3	23	-
18	<i>Encarsia</i>	<i>formosa</i>	Lepidoptera	B	17	18	20	15	18	-
19	<i>Ephestia</i>	<i>kuehniella</i>	Lepidoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Technomyrmex</i>	<i>albipes</i>	Himenoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Leptomyrmex</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Omipholidotos</i>	<i>peucetia</i>	Lepidoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Pheidole</i>	<i>plagiara</i>	Himenoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Pheidole</i>	<i>sauberi</i>	Himenoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Pheidole</i>	<i>planifrons</i>	Himenoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
19	<i>Leptogenys</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	7	6	7	3	8	ST-19
20	<i>Ephestia</i>	<i>kuehniella</i>	Lepidoptera	A	16	14	19	23	4	-
21	<i>Gryllus</i>	<i>firmus</i>	Orthoptera	B	15	16	17	16	16	-
22	<i>Incisitermes</i>	<i>snyderi</i>	Isoptera	A	24	24	28	17	20	-
23	<i>Muscidifurax</i>	<i>uniraptor</i>	Himenoptera	A	8	7	8	6	1	-
23	<i>Nasonia</i>	<i>vitripennis</i>	Himenoptera	A	8	7	8	6	1	-
24	<i>Nasonia</i>	<i>longicornis</i>	Himenoptera	A	2	1	1	3	1	-
25	<i>Nasonia</i>	<i>giraulti</i>	Himenoptera	A	11	17	18	3	17	-
26	<i>Nasonia</i>	<i>vitripennis</i>	Himenoptera	B	9	8	9	7	9	-
27	<i>Ostrinia</i>	<i>scapularis</i>	Lepidoptera	B	9	9	10	8	10	-
28	<i>Protocalliphora</i>	<i>sialia</i>	Diptera	B	25	26	29	15	27	-
29	<i>Solenopsis</i>	<i>invicta</i>	Himenoptera	A	19	20	22	17	20	-
30	<i>Tribolium</i>	<i>confusum</i>	Coleoptera	B	6	5	6	18	7	-
31	<i>Trichogramma</i>	<i>deion</i>	Himenoptera	B	21	22	25	19	21	-
32	<i>Teleogryllus</i>	<i>taiwanemma</i>	Orthoptera	B	9	25	30	20	25	-
33	<i>Camponotus</i>	<i>pennsylvanicus</i>	Himenoptera	A	27	28	32	25	29	-
34	<i>Drosophila</i>	<i>bifasciata</i>	Diptera	A	14	15	16	13	15	-
35	<i>Brugia</i>	<i>malayi</i>	Spurida	D	28	29	33	26	30	-
36	<i>Lycaeides</i>	<i>idas</i>	Lepidoptera	B	9	36	40	7	9	-
37	<i>Polistes</i>	<i>dominulus</i>	Himenoptera	B	9	9	6	8	10	-

ST	Género	especie	Orden	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Complejo ST
37	<i>Tetrastichus</i>	<i>coeruleus</i>	Himenoptera	B	9	9	6	8	10	
38	<i>Jamides</i>	<i>alecto</i>	Lepidoptera	A	37	37	41	34	40 -	
39	<i>Horaga</i>	<i>onyx</i>	Lepidoptera	B	12	14	13	2	41 -	
40	<i>Surendra</i>	<i>vivarna</i>	Lepidoptera	B	38	38	29	35	42 -	
40	<i>Eurema</i>	<i>mandarina</i>	Lepidoptera	B	38	38	29	35	42	
40	<i>Eurema</i>	<i>hecabe</i>	Lepidoptera	B	38	38	29	35	42	
41	<i>Nacaduba</i>	<i>angusta</i>	Lepidoptera	B	39	14	40	36	4 STC-41	
41	<i>Azanus</i>	<i>mirza</i>	Lepidoptera	B	39	14	40	36	4 STC-41	
41	<i>Celastrina</i>	<i>argiolus</i>	Lepidoptera	B	39	14	40	36	4 STC-41	
41	<i>Eurema</i>	<i>mandarina</i>	Lepidoptera	B	39	14	40	36	4 STC-41	
41	<i>Eurema</i>	<i>hecabe</i>	Lepidoptera	B	39	14	40	36	4 STC-41	
42	<i>Spalgis</i>	<i>epius</i>	Lepidoptera	B	40	14	40	36	43 -	
43	<i>Formica</i>	<i>occulta</i>	Himenoptera	A	32	39	42	32	44 -	
44	<i>Pseudomyrmex</i>	<i>apache</i>	Himenoptera	A	41	40	43	17	45 -	
45	<i>Stenamma</i>	<i>snellingi</i>	Himenoptera	A	42	20	44	37	46 -	
46	<i>Azteca</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	43	41	45	17	46 -	
47	<i>Wasmannia</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	43	20	46	38	46 -	
48	<i>Metapone</i>	<i>madagascaria</i>	Himenoptera	A	44	2	47	39	47 -	
49	<i>Myrmica</i>	<i>incompleta</i>	Himenoptera	A	41	20	48	37	46 -	
50	<i>Polyergus</i>	<i>breviceps</i>	Himenoptera	A	41	20	49	40	46 -	
51	<i>Polyrhachis</i>	<i>vindex</i>	Himenoptera	A	45	32	50	6	48 -	
52	<i>Anoplolepis</i>	<i>gracillipes</i>	Himenoptera	A	22	2	51	32	36 -	
52	<i>Lophomyrmex</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	22	2	51	32	36	
53	<i>Notoncus</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	46	42	23	6	17 -	
54	<i>Myrmecorhynchus</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	47	6	7	3	8 ST-19	
55	<i>Pheidole</i>	<i>minutula</i>	Himenoptera	A	41	20	32	17	45 -	
56	<i>Pheidole</i>	<i>sciophila</i>	Himenoptera	B	48	43	52	41	6 -	
57	<i>Camponotus</i>	<i>leonardi</i>	Himenoptera	A	49	44	53	42	49 -	
58	<i>Pheidole</i>	<i>vallicola</i>	Himenoptera	A	19	20	54	43	50 -	
59	<i>Rhytidoponera</i>	<i>metallica</i>	Himenoptera	A	50	2	47	44	51 -	
60	<i>Pheidole</i>	<i>gatesi</i>	Himenoptera	A	18	19	21	5	19 -	
61	<i>Pheidole</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	20	2	47	45	52 -	
62	<i>Opisthophthalmus</i>	<i>capensis</i>	Scorpiones	F	29	30	34	27	31 -	
63	<i>Dorymyrmex</i>	<i>elegans</i>	Himenoptera	A	19	21	55	46	53 -	
64	<i>Opisthophthalmus</i>	<i>latimanus</i>	Scorpiones	F	31	30	36	28	32 -	
65	<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>	Araneae	A	32	33	38	30	37 -	
65	<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>	Araneae	A	32	33	38	30	37	
66	<i>Agelenopsis</i>	<i>longistyla</i>	Araneae	A	33	32	37	29	34 -	
67	<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>	Araneae	A	35	35	22	33	39 -	
68	<i>Agelenopsis</i>	<i>emertoni</i>	Araneae	A	32	34	39	32	36 -	
69	<i>Agelenopsis</i>	<i>naevia</i>	Araneae	A	32	33	38	31	38 -	
70	<i>Agelenopsis</i>	<i>pennsylvanica</i>	Araneae	A	36	32	37	29	35 -	
70	<i>Barronopsis</i>	<i>texana</i>	Araneae	A	36	32	37	29	35 -	
71	<i>Agelenopsis</i>	<i>pennsylvanica</i>	Araneae	A	34	32	37	29	34	
71	<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>	Araneae	A	34	32	37	29	34	
72	<i>Opisthophthalmus</i>	<i>granifrons</i>	Scorpiones	F	30	31	35	48	33 -	
73	<i>Agelenopsis</i>	<i>utahana</i>	Araneae	A	36	32	37	47	35 -	
74	<i>Agelenopsis</i>	<i>emertoni</i>	Araneae	A	51	46	22	33	54 -	
75	<i>Agelenopsis</i>	<i>longistyla</i>	Araneae	A	52	20	57	58	55 -	

ST	Genero	especie	Orden	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Complejo ST
76	<i>Agelenopsis</i>	<i>oklahoma</i>	Araneae	A	52	45	56	33	56	-
77	<i>Opisthophthalmus</i>	<i>litoralis</i>	Scorpiones	F	29	56	58	60	57	-
78	<i>Opisthophthalmus</i>	<i>chaperi</i>	Scorpiones	F	30	55	72	48	70	-
79	<i>Hirtodrosophila</i>	<i>trilineata</i>	Diptera	A	14	15	23	56	15	-
80	<i>A_M6Ph1</i>	<i>Unknow</i>		A	22	23	63	3	23	-
81	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	43	32	11	6	58	-
82	<i>A_M4CMy</i>	<i>Unknow</i>		A	53	53	64	55	63	-
83	<i>A_M11He</i>	<i>Unknow</i>		A	54	52	62	3	62	-
84	<i>B_M14My1</i>	<i>Unknow</i>		B	55	51	40	7	9	-
85	<i>A_M16My</i>	<i>Unknow</i>		A	56	50	61	6	61	-
86	<i>A_PS108</i>	<i>Unknow</i>		A	57	49	11	50	15	-
87	<i>A_PS122</i>	<i>Unknow</i>		A	58	48	60	6	60	-
88	<i>A_SWRS3C</i>	<i>Unknow</i>		A	59	47	59	32	59	-
89	<i>A_Cresc2</i>	<i>Unknow</i>		A	62	1	1	3	1	ST-13
90	<i>Zootermopsis</i>	<i>angusticollis</i>	Isoptera	H	64	54	71	57	69	-
91	<i>Hypolimnas</i>	<i>bolina</i>	Lepidoptera	A	67	6	7	3	8	ST-19
92	<i>A_ElmMoth86</i>	<i>Unknow</i>		A	54	59	68	3	67	-
93	<i>A_PS68</i>	<i>Unknow</i>		A	57	61	70	6	15	-
94	<i>A_CobbStaph</i>	<i>Unknow</i>		A	60	62	65	54	64	-
95	<i>Suillia</i>	<i>sp</i>	Diptera	A	61	57	66	53	65	-
96	<i>A_ElmMusc82</i>	<i>Unknow</i>		A	63	57	69	51	68	-
97	<i>A_CrescMusc</i>	<i>Unknow</i>		A	66	58	67	52	66	-
98	<i>Dinn_B</i>	<i>Unknow</i>		B	79	71	88	69	27	-
99	<i>Drosophila</i>	<i>testacea</i>	Diptera	A	10	72	11	14	11	-
100	<i>A_HMSph6</i>	<i>Unknow</i>		A	57	32	84	6	77	-
101	<i>A_MenChl2</i>	<i>Unknow</i>		A	53	58	85	70	79	-
102	<i>A_PanAA</i>	<i>Unknow</i>		A	23	60	86	21	26	-
103	<i>Polybia</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	B	69	65	87	62	27	-
104	<i>B_SFChl1</i>	<i>Unknow</i>		B	9	66	88	15	80	-
105	<i>B_SFChl2</i>	<i>Unknow</i>		B	9	66	88	15	76	-
106	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	64	49	63	75	-
107	<i>A_B1D_Pan</i>	<i>Unknow</i>		A	68	1	1	3	1	ST-13
108	<i>Brangas</i>	<i>felderi</i>	Lepidoptera	B	71	67	74	65	6	-
109	<i>Thersamonia</i>	<i>thersamon</i>	Lepidoptera	B	70	64	40	36	4	-
110	<i>Iraota</i>	<i>rochana</i>	Lepidoptera	A	37	37	89	64	40	-
111	<i>Odontomachus</i>	<i>clarus</i>	Himenoptera	A	23	2	75	67	74	-
112	<i>Ochetellus</i>	<i>glaber</i>	Himenoptera	A	7	6	76	3	8	ST-19
113	<i>Libythea</i>	<i>myrrha</i>	Lepidoptera	B	9	68	6	66	10	-
114	<i>Pheidole</i>	<i>coloradensis</i>	Himenoptera	A	74	20	78	17	20	-
115	<i>Pheidole</i>	<i>micula</i>	Himenoptera	A	72	20	45	17	20	-
116	<i>Pheidole</i>	<i>vistana</i>	Himenoptera	A	75	20	45	17	72	-
117	<i>Pheidole</i>	<i>obtusospinosa</i>	Himenoptera	A	43	20	79	17	46	-
118	<i>Pheidole</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	7	6	80	3	8	ST-19
119	<i>Evagetes</i>	<i>parvus</i>	Himenoptera	A	76	33	81	32	71	-
120	<i>Aenictus</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	20	70	82	45	51	-
121	<i>Crematogaster</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	77	2	83	45	51	-
122	<i>Solenopsis</i>	<i>sp</i>	Himenoptera	A	78	37	41	3	62	-
123	<i>Monomorium</i>	<i>chinense</i>	Himenoptera	A	78	37	90	3	62	-
124	<i>Ocymyrmex</i>	<i>picardi</i>	Himenoptera	F	73	69	77	68	73	-



ST	Genero	especie	Orden	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Complejo ST
125	<i>Hypolimnas</i>	<i>bolina</i>	Lepidoptera	B	4	14	40	73	4	-
126	<i>A_PanBCI_Calyp16</i>	<i>Unknow</i>		A	97	76	95	74	15	-
127	<i>A_MexSon_Calyp150671</i>	<i>Unknow</i>		A	78	37	62	3	81	-
128	<i>B_NY_Chloro150737a</i>	<i>Unknow</i>		B	9	73	91	71	82	-
129	<i>B_NY_Chloro150737b</i>	<i>Unknow</i>		B	91	14	40	7	9	-
130	<i>A_NY_Calyp150743b</i>	<i>Unknow</i>		A	92	47	92	32	59	-
131	<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>	Coleoptera	A	53	77	96	55	61	-
132	<i>A_NY_Calyp150744c</i>	<i>Unknow</i>		A	78	37	62	3	62	-
133	<i>A_Pan_Droso150749b</i>	<i>Unknow</i>		A	93	37	93	3	62	-
134	<i>A_Pan_Calyp150759</i>	<i>Unknow</i>		A	94	74	94	72	84	-
135	<i>A_Pan_Calyp150764</i>	<i>Unknow</i>		A	95	75	92	32	85	-
136	<i>B_Pan_Calyp150776</i>	<i>Unknow</i>		B	96	14	3	73	4	-
137	<i>Apoica</i>	<i>pallens</i>	Himenoptera	F	65	63	73	61	78	-
138	<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>	Coleoptera	A	98	33	98	32	152	-
139	<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>	Coleoptera	A	99	47	97	75	153	-
140	<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>	Coleoptera	A	99	47	97	76	154	-
141	<i>Colias</i>	<i>elate poliographus</i>	Lepidoptera	B	100	14	40	73	4	-
142	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	78	6	77	10	-
143	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	103	64	40	63	75	-
144	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	104	81	102	78	157	-
145	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	4	14	3	36	4	STC-41
146	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	4	14	40	36	4	STC-41
147	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	4	14	40	7	4	STC-41
148	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	14	40	73	4	STC-41
149	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	80	100	8	156	-
150	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	16	14	40	36	4	STC-41
151	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	39	11	101	36	4	STC-41
152	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	39	14	40	7	4	STC-41
153	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	96	14	40	73	4	STC-41
154	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	101	79	40	73	4	STC-41
155	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	101	79	99	73	155	STC-41
156	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	102	14	100	36	4	STC-41
157	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	102	14	29	36	42	STC-41
158	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	8	84	103	79	160	-
159	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	53	84	85	70	79	-
160	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	101	85	40	22	4	-
161	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	105	14	3	73	4	-
162	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	108	73	40	80	9	-
163	<i>B_NY_Calyp101204</i>	<i>Unknow</i>		B	107	87	29	35	27	-
164	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	54	52	62	82	62	-
165	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	54	52	62	3	164	-
166	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	105	88	106	7	165	-
167	<i>Cordylochernes</i>	<i>scorpioides</i>	Pseudoescorpiones	Unknow	110	89	107	83	166	-
168	<i>Cordylochernes</i>	<i>scorpioides</i>	Pseudoescorpiones	Unknow	111	90	108	83	167	-
169	<i>Odontotermes</i>	<i>horni</i>	Isoptera	F	117	95	115	86	171	-
170	<i>Odontotermes</i>	<i>horni</i>	Isoptera	F	115	95	112	86	171	-
171	<i>Odontotermes</i>	<i>sp</i>	Isoptera	F	116	97	114	88	172	-
172	<i>Odontotermes</i>	<i>horni</i>	Isoptera	F	114	94	111	85	170	-
173	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	109	86	29	81	27	-
174	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	9	91	109	15	27	-

ST	Genero	especie	Orden	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Complejo ST
175	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	109	86	87	81	27	-
176	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	39	14	119	7	9	-
177	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	119	102	120	81	175	-
178	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	119	101	120	81	175	-
179	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	119	100	120	81	175	-
180	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	119	101	120	90	175	-
181	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	119	98	121	81	177	-
182	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	120	99	122	81	176	-
183	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	121	101	120	89	175	-
184	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	122	101	120	91	175	-
185	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	123	103	123	92	178	-
186	<i>Hylyphantes</i>	<i>graminicola</i>	Araneae	Unknow	124	104	120	93	179	-
187	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	125	4	74	4	6	-
188	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	105	125	95	180	-
189	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	126	87	124	94	132	-
190	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	14	13	96	181	-
191	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	106	15	96	183	-
192	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	14	15	96	183	-
193	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	79	107	124	97	132	-
194	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	127	14	126	11	9	-
195	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	14	15	96	14	-
196	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	14	15	96	182	-
197	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	128	108	127	98	20	-
198	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	1	1	1	21	1	-
199	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	23	2	86	3	26	-
200	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	129	1	128	99	118	-
201	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	130	110	129	100	102	-
202	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	1	27	1	1	3	-
203	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	112	130	101	187	-
204	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	66	132	102	190	-
205	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	131	76	131	56	131	-
206	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	132	66	88	102	132	-
207	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	53	77	64	55	191	-
208	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	133	32	133	103	49	-
209	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	53	113	134	6	63	-
210	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	53	77	64	55	61	-
211	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	104	115	102	78	157	-
212	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	103	64	136	63	75	-
213	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	106	11	13	105	162	-
214	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	134	91	139	106	194	-
215	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	39	14	40	7	195	-
216	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	119	140	107	9	-
217	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	135	120	141	108	197	-
218	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	136	91	142	109	9	-
219	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	38	143	23	4	-
220	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	9	121	143	23	4	-
221	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	126	122	144	106	196	-
222	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	137	123	145	110	198	-
223	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	138	124	146	70	199	-
224	<i>Unknow</i>	<i>Unknow</i>		Unknow	139	125	147	111	200	-

ST	Genero	especie	Orden	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Complejo ST
225	Unknow	Unknow		Unknow	140	66	29	112	27	-
226	Unknow	Unknow		Unknow	141	127	23	114	15	-
227	Unknow	Unknow		Unknow	141	127	23	115	15	-
228	Unknow	Unknow		Unknow	8	127	23	113	15	-
229	Unknow	Unknow		Unknow	142	128	23	113	15	-
230	Unknow	Unknow		Unknow	143	129	23	56	15	-
231	Unknow	Unknow		Unknow	128	109	127	98	20	-
232	Unknow	Unknow		Unknow	144	47	149	116	202	-
233	Unknow	Unknow		Unknow	145	130	150	117	203	-
234	Unknow	Unknow		Unknow	62	143	60	3	220	-
235	Unknow	Unknow		Unknow	9	144	91	36	221	-

Tabla E3: Parte de las secuencias empleadas en el análisis filogenético basado en los genes del Sistema de Clasificación Multilocus ordenadas en orden alfabético en relación a la especie hospedadora, disponibles en la base de datos.

Genero	especie	Cepa	Orden	Supergrupo	ST
<i>Acraea eponina</i>	<i>eponina</i>		Lepidoptera	B	4
<i>Acraea encedon</i>	<i>encedon</i>		Lepidoptera	B	3
<i>Acromis sparsa</i>	<i>sparsa</i>		Coleoptera	A	5
<i>Aedes albopictus</i>	<i>albopictus</i>		Diptera	A	2
<i>Aenictus</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	120
<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>		Araneae	A	65
<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>		Araneae	A	65
<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>		Araneae	A	67
<i>Agelenopsis</i>	<i>aperta</i>		Araneae	A	71
<i>Agelenopsis</i>	<i>emertoni</i>		Araneae	A	68
<i>Agelenopsis</i>	<i>emertoni</i>		Araneae	A	74
<i>Agelenopsis</i>	<i>longistyla</i>		Araneae	A	66
<i>Agelenopsis</i>	<i>longistyla</i>		Araneae	A	75
<i>Agelenopsis</i>	<i>naevia</i>		Araneae	A	69
<i>Agelenopsis</i>	<i>oklahoma</i>		Araneae	A	76
<i>Agelenopsis</i>	<i>pennsylvanica</i>		Araneae	A	70
<i>Agelenopsis</i>	<i>pennsylvanica</i>		Araneae	A	71
<i>Agelenopsis</i>	<i>utahana</i>		Araneae	A	73
<i>Anoplolepis</i>	<i>gracillipes</i>		Himenoptera	A	52
<i>Anthene</i>	<i>emolus</i>		Lepidoptera	B	37
<i>Apoica</i>	<i>pallens</i>		Himenoptera	F	137
<i>Armadillidium</i>	<i>vulgare</i>		Isopoda	B	6
<i>Azanus</i>	<i>mirza</i>		Lepidoptera	B	41
<i>Azteca</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	46
<i>Barronopsis</i>	<i>texana</i>		Araneae	A	70
<i>Brangas</i>	<i>felderi</i>		Lepidoptera	B	108
<i>Brugia</i>	<i>malayi</i>		Spurida	D	35
<i>Camponotus</i>	<i>leonardi</i>		Himenoptera	A	57
<i>Camponotus</i>	<i>pennsylvanicus</i>		Himenoptera	A	33
<i>Celastrina</i>	<i>argiolus</i>		Lepidoptera	B	41
<i>Chelymorphia</i>	<i>alternans</i>		Coleoptera	B	7
<i>Cimex</i>	<i>lectularius</i>		Heteroptera	F	8
<i>Colias</i>	<i>elate poliographus</i>		Lepidoptera	B	141
<i>Cordylochernes</i>	<i>scorpioides</i>		Pseudoescorpiones	Unknow	167
<i>Cordylochernes</i>	<i>scorpioides</i>		Pseudoescorpiones	Unknow	168
<i>Crematogaster</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	121
<i>Culex</i>	<i>pipiens</i>		Diptera	B	9
<i>Dorymyrmex</i>	<i>elegans</i>		Himenoptera	A	63
<i>Drosophila</i>	<i>bifasciata</i>		Diptera	A	34
<i>Drosophila</i>	<i>innubila</i>		Diptera	A	10
<i>Drosophila</i>	<i>innubila</i>	<i>Dinn_B</i>	Unknow	B	98
<i>Drosophila</i>	<i>melanogaster</i>		Diptera	A	1
<i>Drosophila</i>	<i>munda</i>		Diptera	A	10
<i>Drosophila</i>	<i>neotestacea</i>		Diptera	A	11
<i>Drosophila</i>	<i>orientacea</i>		Diptera	A	12
<i>Drosophila</i>	<i>recens</i>		Diptera	A	13
<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>		Diptera	A	14
<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>		Diptera	A	17
<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>		Diptera	B	15
<i>Drosophila</i>	<i>simulans</i>		Diptera	B	16
<i>Drosophila</i>	<i>testacea</i>		Diptera	A	99
<i>Encarsia</i>	<i>formosa</i>		Lepidoptera	B	18
<i>Ephestia</i>	<i>kuehniella</i>		Lepidoptera	A	19
<i>Ephestia</i>	<i>kuehniella</i>		Lepidoptera	A	20

<i>Genero</i>	<i>especie</i>	<i>Cepa</i>	<i>Orden</i>	<i>Supergrupo</i>	<i>ST</i>
<i>Pheidole</i>	<i>micula</i>		Himenoptera	A	115
<i>Pheidole</i>	<i>minutula</i>		Himenoptera	A	55
<i>Pheidole</i>	<i>obtusospinosa</i>		Himenoptera	A	117
<i>Pheidole</i>	<i>plagiara</i>		Himenoptera	A	19
<i>Pheidole</i>	<i>planifrons</i>		Himenoptera	A	19
<i>Pheidole</i>	<i>sauberi</i>		Himenoptera	A	19
<i>Pheidole</i>	<i>sciophila</i>		Himenoptera	B	56
<i>Pheidole</i>	<i>vallicola</i>		Himenoptera	A	58
<i>Pheidole</i>	<i>vistana</i>		Himenoptera	A	116
<i>Pheidole</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	61
<i>Pheidole</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	118
<i>Polistes</i>	<i>dominulus</i>		Himenoptera	B	37
<i>Polybia</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	B	103
<i>Polyergus</i>	<i>breviceps</i>		Himenoptera	A	50
<i>Polyrhachis</i>	<i>vindex</i>		Himenoptera	A	51
<i>Protocalliphora</i>	<i>sialia</i>		Diptera	B	28
<i>Pseudomyrmex</i>	<i>apache</i>		Himenoptera	A	44
<i>Rhytidoponera</i>	<i>metallica</i>		Himenoptera	A	59
<i>Solenopsis</i>	<i>invicta</i>		Himenoptera	A	29
<i>Solenopsis</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	122
<i>Spalgi</i>	<i>epius</i>		Lepidoptera	B	42
<i>Stenamma</i>	<i>snellingi</i>		Himenoptera	A	45
<i>Suillia</i>	<i>sp</i>		Diptera	A	13
<i>Suillia</i>	<i>sp</i>		Diptera	A	95
<i>Surendra</i>	<i>vivarna</i>		Lepidoptera	B	40
<i>Technomyrmex</i>	<i>albipes</i>		Himenoptera	A	19
<i>Teleogryllus</i>	<i>taiwanemma</i>		Orthoptera	B	32
<i>Tetrastichus</i>	<i>coeruleus</i>		Himenoptera	B	37
<i>Thersamonia</i>	<i>thersamon</i>		Lepidoptera	B	109
<i>Tribolium</i>	<i>confusum</i>		Coleoptera	B	30
<i>Trichogramma</i>	<i>deion</i>		Himenoptera	B	31
<i>Wasmannia</i>	<i>sp</i>		Himenoptera	A	47
<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>		Coleoptera	A	131
<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>		Coleoptera	A	138
<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>		Coleoptera	A	139
<i>Xylosandrus</i>	<i>germanus</i>		Coleoptera	A	140
<i>Zootermopsis</i>	<i>angusticollis</i>		Isoptera	H	90
	<i>Unknow</i>	<i>A_B1D_Pan</i>	Diptera	A	107
	<i>Unknow</i>	<i>A_CobbStaph</i>	Unknow	A	94
	<i>Unknow</i>	<i>A_Cresc2</i>	Unknow	A	89
	<i>Unknow</i>	<i>A_CrescMusc</i>	Unknow	A	97
	<i>Unknow</i>	<i>A_ElmMoth86</i>	Unknow	A	92
	<i>Unknow</i>	<i>A_ElmMusc82</i>	Unknow	A	96
	<i>Unknow</i>	<i>A_HMSph6</i>	Unknow	A	100
	<i>Unknow</i>	<i>A_M11He</i>	Unknow	A	83
	<i>Unknow</i>	<i>A_M16My</i>	Unknow	A	85
	<i>Unknow</i>	<i>A_M4CMy</i>	Unknow	A	82
	<i>Unknow</i>	<i>A_M6Ph1</i>	Unknow	A	80
	<i>Unknow</i>	<i>A_MenCh12</i>	Unknow	A	101
	<i>Unknow</i>	<i>A_MexSon_Calyp150671</i>	Unknow	A	127
	<i>Unknow</i>	<i>A_NY_Calyp150743b</i>	Unknow	A	130
	<i>Unknow</i>	<i>A_NY_Calyp150744c</i>	Unknow	A	132
	<i>Unknow</i>	<i>A_Pan_Calyp150759</i>	Unknow	A	134
	<i>Unknow</i>	<i>A_Pan_Calyp150764</i>	Unknow	A	135
	<i>Unknow</i>	<i>A_Pan_Droso150749b</i>	Unknow	A	133
	<i>Unknow</i>	<i>A_PanAA</i>	Unknow	A	102
	<i>Unknow</i>	<i>A_PanBCI_Calyp16</i>	Unknow	A	126
	<i>Unknow</i>	<i>A_PS108</i>	Unknow	A	86
	<i>Unknow</i>	<i>A_PS122</i>	Unknow	A	87

<i>Genero</i>	<i>especie</i>	<i>Cepa</i>	<i>Orden</i>	<i>Supergrupo</i>	<i>ST</i>
	Unknow	A_PS68	Unknow	A	93
	Unknow	A_SWRS3C	Unknow	A	88
	Unknow	B_M14My1	Unknow	B	84
	Unknow	B_NY_Calyp101204	Unknow	B	163
	Unknow	B_NY_Chloro150737a	Unknow	B	128
	Unknow	B_NY_Chloro150737b	Unknow	B	129
	Unknow	B_Pan_Calyp150776	Unknow	B	136
	Unknow	B_SFChl1	Unknow	B	104
	Unknow	B_SFChl2	Unknow	B	105
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	81
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	106
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	142
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	143
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	144
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	145
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	146
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	147
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	148
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	149
Unknow	Unknow		Unknow	Unknow	150

Tabla E4: Parte de las secuencias empleadas en el análisis filogenético basado en el gen *wsp* disponibles en la base de datos.

id	wsp id	Supergrupo	Género del hospedador	wsp	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4
1	wsp_111		<i>Solenopsis</i>	111	66	76	76	63
1	wsp_31	A	<i>Drosophila</i>	31	1	12	21	24
3	wsp_127		<i>Bactericera</i>	127	73	79	23	79
3	wsp_5	A	<i>Acromis</i>	5	4	4	5	4
4	wsp_128		<i>Bactericera</i>	128	74	20	24	79
4	wsp_9	A	<i>Camponotus</i>	9	8	1	9	25
5	wsp_11	A	<i>Drosophila</i>	11	9	9	12	9
5	wsp_22	A	<i>Muscidifurax</i>	22	17	19	20	18
6	wsp_130	B	<i>Tetranychus</i>	130	72	16	23	77
9	wsp_14	A	<i>Drosophila</i>	14	1	12	14	12
10	wsp_4	A	<i>Drosophila</i>	4	1	12	14	12
12	wsp_1	A	<i>Aedes</i>	1	1	1	1	1
13	wsp_18	A	<i>Ephestia</i>	18	13	15	17	14
14	wsp_21	A	<i>Incisitermes</i>	21	16	18	17	17
16	wsp_23	A	<i>Nasonia</i>	23	1	12	21	19
17	wsp_33	A	<i>Nasonia</i>	33	1	23	15	25
19	wsp_8	B	<i>Chelymophra</i>	8	7	7	8	7
20	wsp_29	B	<i>Tribolium</i>	29	22	17	3	22
21	wsp_27	B	<i>Protocalliphora</i>	27	20	20	3	23
21	wsp_28	B	<i>Protocalliphora</i>	27	20	20	3	23
22	wsp_2	B	<i>Acraea</i>	2	2	2	2	2
23	wsp_3	B	<i>Acraea</i>	3	3	3	3	3
24	wsp_20	B	<i>Gryllus</i>	20	15	17	19	23
25	wsp_30	B	<i>Teleogryllus</i>	30	23	22	26	23
26	wsp_15	B	<i>Drosophila</i>	15	10	8	11	13
28	wsp_6	B	<i>Armadillidium</i>	6	5	5	6	5
29	wsp_10	B	<i>Culex</i>	10	10	8	10	8
32	wsp_26	B	<i>Ostrinia</i>	26	19	17	24	20
34	wsp_25	B	<i>Nasonia</i>	25	18	16	23	16
36	wsp_7	F	<i>Cimex</i>	7	6	6	7	6
42	wsp_35	F	<i>Opisthophthalmus</i>	35	25	25	28	27
43	wsp_36	F	<i>Opisthophthalmus</i>	36	26	26	29	28
44	wsp_37	F	<i>Opisthophthalmus</i>	37	27	27	30	29
47	wsp_74	A		74	1	12	21	54
49	wsp_75	A		75	11	9	15	25
51	wsp_76	B		76	18	16	55	16
52	wsp_77	A		77	1	52	56	19
54	wsp_79	A		79	9	53	57	9
57	wsp_80	A		80	50	54	58	55
61	wsp_113	A	<i>Rhagoletis</i>	113	67	77	12	9
68	wsp_38	A	<i>Agelenopsis</i>	38	28	29	33	32
69	wsp_87	B	<i>Polistes</i>	87	9	9	60	25
78	wsp_85	A	<i>Suillia</i>	85	53	28	53	58
81	wsp_90	A		90	53	59	53	32
82	wsp_84	A		84	1	56	15	25
89	wsp_103	A		103	9	9	12	25
91	wsp_89	A		89	54	28	62	60
94	wsp_106	B		106	65	72	73	72
104	wsp_46	A	<i>Pseudomyrmex</i>	46	36	37	40	36
112	wsp_48	A	<i>Polyrhachis</i>	48	9	9	12	25
114	wsp_49	A	<i>Notoncus</i>	49	9	9	12	9
126	wsp_40	A	<i>Pheidole</i>	40	30	28	31	30
130	wsp_115	B	<i>Brangas</i>	115	68	8	77	13
133	wsp_117	A	<i>Iraota</i>	117	70	34	15	74
134	wsp_118	A	<i>Odontomachus</i>	118	66	76	78	63
137	wsp_120	A	<i>Pheidole</i>	120	66	76	42	39
138	wsp_119	A	<i>Pheidole</i>	119	21	40	79	75
140	wsp_122	A	<i>Pheidole</i>	122	42	43	9	25

id	wsp id	Supergrupo	Género del hospedador	wsp	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4
144	wsp_124	A	<i>Crematogaster</i>	124	38	39	46	43
151	wsp_151	A		151	89	34	15	25
155	wsp_154	A		154	90	100	100	63
158	wsp_157	A		157	91	34	101	94
160	wsp_158	A		158	28	102	39	18
164	wsp_101	F	<i>Apoica</i>	101	64	70	71	69
167	wsp_43	A	<i>Agelenopsis</i>	43	31	32	35	34
168	wsp_41	A	<i>Agelenopsis</i>	41	28	31	34	32
170	wsp_39	A	<i>Agelenopsis</i>	39	29	30	32	31
179	wsp_45	A	<i>Agelenopsis</i>	45	31	33	37	34
182	wsp_44	A	<i>Agelenopsis</i>	44	31	32	36	34
325	wsp_83	A	<i>Ephestia</i>	83	51	55	15	57